

***SEQUENZSELEKTIVE, METALLFREIE DNA-SPALTER AUF DER BASIS VON  
BISGUANIDINIUMALKOHOLEN***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften

vorgelegt dem  
Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Goethe-Universität in  
Frankfurt am Main

von  
Stefan Ullrich  
aus  
Hanau

Frankfurt am Main  
2009

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Goethe-Universität Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. Dieter Steinhilber
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Michael W. Göbel
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Joachim Engels
Datum der Disputation:	13.05.2009

*Meiner Familie*

*„Die Erfahrung ist wie eine Laterne im Rücken:  
sie beleuchtet stets nur das Stück Weg,  
das wir bereits hinter uns haben.“*

**Konfuzius (chinesischer Philosoph)**

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2004 bis September 2008 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Diese Arbeit wäre ohne Unterstützung (so) nicht entstanden, und daher möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel danke ich für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, die sehr interessante und fesselnde Themenstellung, die hervorragenden experimentellen Bedingungen zur Durchführung dieser Arbeit, für die ausgezeichnete Betreuung und für die zahlreichen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. G. Dürner und seiner Mitarbeiterin Frau G. Stracke danke ich für die HPLC-Analytik und HPLC-Trennungen. Frau G. Stracke danke ich darüber hinaus für die Bereitstellung von destillierten Lösungsmitteln.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Dr. G. Dürner speziell für zahlreiche Gespräche, Spaß und Humor innerhalb und außerhalb der Wissenschaft, sowie für zahlreiche Lehrstunden, um mir HPLC beizubringen.

Mein Dank gilt weiter dem Team um Herrn Dr. J. G. Zimmermann für die Messung der NMR-Spektren, Frau M. Christof für die Anfertigung der Elementaranalysen, und Frau I. Pries sowie Frau H. Brill für die Messung von ESI- bzw. MALDI-Massenspektren. Für die Messung von LILBID-Massenspektren danke ich Frau Dr. Nina Morgner.

Herrn Dr. J. W. Bats danke ich für die Aufnahme und Auswertungen von Kristallstrukturanalysen.

Für die Planung und Durchführung von in vitro-Experimenten geht mein Dank an Frau E. Kalden und ganz besonders an Frau Dr. U. Scheffer, die eine schier endlose Reihe an Experimenten geplant und auch ausgeführt hat. Dazu danke ich ihr ganz herzlich für die kritische Korrektur und für die wertvollen Hinweise zum Verfassen der vorliegenden Arbeit.

Für die Hilfe bei Experimenten im Mikromaßstab unter Sauerstoffausschluss und für den Spaß und die Freundschaft innerhalb und außerhalb der Universität danke ich im speziellen Herrn Dipl.-Chem. D. Eckensberger.

Ich danke des Weiteren Herrn Dr. Z. Nazir für die Hilfestellung und wertvollen Tipps zu Anfang und während der Anfertigung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an meine Laborkollegen Herrn Dipl.-Chem. M. Zeiger, Herrn Dr. D. Akalay, Herrn Dr. S. Peter, Herrn Dipl.-Chem. M. Weimar und Herrn Dipl.-Chem. S. Breitung für das freundliche Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft und den täglichen Spaß im Labor.

Herrn Dr. M. Suhartono, Herrn Dipl.-Chem. C. Pinto-Gomez, Herrn Dr. C. Gnaccarini, Frau Dipl.-Chem. S. Brüß und Frau Dipl.-Chem. K. Beier danke ich neben der netten Laborzeit für den gelegentlichen Austausch über die Wissenschaft hinaus.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Freundin Sandra Wollschlag, für viele kritische Gespräche, das Korrekturlesen dieser Arbeit, ihre Liebe, Unterstützung, Rückhalt und Ermutigung, vor allem, aber nicht ausschließlich, in schwierigen Zeiten.

Mein größter Dank geht an meine Schwester Sarah und vor allem an meine Mutter Vincenza Ullrich, die mich auf meinem Weg stets begleitet, unterstützt und ermutigt haben. Ohne sie wäre ich nicht geworden, was ich heute bin.

## Kurzfassung

### Sequenzselektive, metallfreie DNA-Spalter auf der Basis von Bisguanidiniumalkoholen

Stefan Ullrich

Die Aufklärung der dreidimensionalen Helix-Struktur der DNA, des Trägermoleküls der genetischen Information aller Lebewesen, durch Watson und Crick im Jahre 1953 ermöglichte eine ganz neue Sichtweise auf ihre Eigenschaften und viele zelluläre Prozesse. Von besonderem Interesse sind hier u.a. Mechanismen, bei denen die DNA an den Phosphaten nucleophil substituiert wird, wie dies beispielsweise bei der Rekombination oder der Transkription geschieht. Dies ist daher interessant, weil sich die DNA gegenüber nucleophilen Angriffen in verschiedenen Experimenten als überaus stabil und reaktionsträge gezeigt hat. Spezialisierte Enzyme wie die Staphylokokkennuklease oder Restriktionsendonukleasen nutzen u.a. Metall-Ionen, um Phosphoryltransfer-Reaktionen zu katalysieren und in eine akzeptable Zeitskala zu verschieben. Die Topoisomerase vom Typ I zeigt eindrucksvoll, dass Katalyse solcher Reaktionen auch ohne Metall-Ion möglich ist, womit auch gleichzeitig die Quelle für eine potentielle oxidative Schädigung der DNA entfernt ist. Leider ist die Palette der natürlich vorkommenden Enzyme begrenzt.

Die Erforschung und Entwicklung von künstlichen Nukleasen ermöglicht daher potentiell den zukünftigen Einsatz neuer, maßgeschneiderter Werkzeuge für die Biochemie und die Biotechnologie, sowie langfristig die Bereitstellung neuartiger Chemotherapeutika.

Vom aktiven Zentrum der Staphylokokkennuklease abgeleitete Moleküle auf Bisguanidinium-Naphthol-Basis bzw. deren Derivate zeigten in der Vergangenheit deutliche Aktivität als metallfreie, unspezifische Spalter von Plasmid-DNA.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die weitere Entwicklung und Charakterisierung neuer unspezifischer und potentiell sequenzselektiver Bisguanidinium-Naphthol-Derivate.

Hierbei wurde eine neue, zuverlässige Synthesestrategie für Bisguanidinium-Naphthole und parallel dazu ein neuer und flexibler Weg der Flüssigphasen-Synthese von DNA-bindenden Polyamiden ausgearbeitet, um daraus DNA-bindende Konjugate herzustellen. Vier unspezifische Moleküle (**45**, **94**, **95**, **97**) und zwei Konjugate (**46** und **140**) wurden dann bei physiologischen Bedingungen auf ihre Spaltaktivität gegenüber Plasmid-DNA und linearer Duplex-DNA untersucht. Bei allen oben genannten Verbindungen konnte -verglichen mit der Stamm-Verbindung **36** aus Vorgängerarbeiten- eine erhöhte Aktivität gegenüber Plasmid-DNA bestimmt werden, die im Falle der Konjugate zwischen 4000- und 8000-fach liegt. Zur weiteren Charakterisierung wurden Experimente in Anwesenheit von EDTA oder  $Mg^{2+}$ , zur pH-Abhängigkeit und zur Kinetik der Spalt-Reaktion durchgeführt.

Erste Testreihen zum Nachweis sequenzselektiver DNA-Spaltung lieferten kein abschließendes Ergebnis, gaben jedoch erste Hinweise auf Selektivität, welche zur Zeit näher untersucht und überprüft werden.

## **Abstract**

### **Sequenceselective, metal-free DNA-Cleavers based on Bisguanidiniumalcohols**

Stefan Ullrich

The structural elucidation of the three-dimensional helix-structure of DNA, the carrier molecule of the genetic information of all living beings, by Watson and Crick in 1953 allowed for a completely new view on properties of various cellular processes. Mechanisms, in which DNA is substituted nucleophilically on its phosphates, e.g. in transcription or recombination, are of particular interest. DNA showed to be extremely resistant and chemically inert towards nucleophilic attacks in various experiments, hence specialized enzymes like Staphylococcal nuclease or Restriction endonucleases are needed to catalyze this reaction. These biocatalysts use, amongst others, metal-ions to catalyze the Phosphoryl-transfer reaction and to shift it to an acceptable time-scale.

The metal-free catalysis of such a reaction is impressively demonstrated by Topoisomerase type I, whereby the risk of potential oxidative damage of DNA is removed. Unfortunately, the repertory of naturally occurring enzymes is limited.

Research and development of artificial nucleases potentially enables the future application of new tailor-made tools for biochemistry and biotechnology, as well as the preparation of novel chemotherapeutics on the long term.

Molecules derived from the active site of Staphylococcal nuclease and based on Bisguanidinium-alcohols showed considerable activity as metal-free and unspecific cleavers of plasmid-DNA in the past. The present thesis describes the further development and characterization of new unspecific as well as potentially sequence-selective Bisguanidinium-alcohol derivatives.

Here, a new and reliable synthesis for Bisguanidinium-alcohols and in parallel, a new and flexible way of liquid-phase synthesis of DNA-binding polyamides was elaborated to yield DNA-binding conjugates. Then four unspecific molecules (**45**, **94**, **95**, **97**) and two conjugates (**46** and **140**) were examined for their cleavage activity towards plasmid-DNA and linear duplex-DNA. All of the mentioned compounds exhibited a higher activity compared to the initial compound **36**, and reached between 4000- and 8000fold in case of the conjugates.

For further characterization experiments were carried out to determine kinetical data, the pH-dependency of the cleavage-reaction, and the influence of EDTA or  $Mg^{2+}$ .

Preliminary tests to verify sequence-selective DNA-cleavage did not deliver a final result, but showed a first hint of selective cleavage, which is currently investigated in more detail.



<b>1.</b>	<b><i>EINLEITUNG</i></b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b><i>STRUKTURELLE CHARAKTERISTIKA DER DNA</i></b> .....	<b>3</b>
2.1	Allgemeines .....	3
2.2	Die Bausteine der DNA.....	3
2.3	Struktur und Konformation von DNA-Duplexen.....	5
2.3.1	Die B-DNA.....	5
2.3.2	Die A-DNA.....	5
2.3.3	Die Z-DNA .....	6
<b>3.</b>	<b><i>PHOSPHORYLTRANSFER UND ENZYMMIMETIKA</i></b> .....	<b>9</b>
3.1	Mechanistische Aspekte der Phosphoryltransfer-Reaktionen .....	9
3.2	Enzymatische Katalyse der Phosphoryltransfer-Reaktionen .....	10
3.3	Klassifikation von Phosphodiester-spaltenden Enzymen .....	11
3.3.1	Metallhaltige Enzyme .....	11
3.3.2	Metallfreie Enzyme .....	12
3.4	Künstliche Spalter von Phosphodiestern .....	13
3.4.1	Metallhaltige Modelle .....	13
3.4.2	Metallfreie Modelle.....	16
3.4.3	Übersicht über die Vorgängerarbeiten .....	18
3.4.3.1	Verbindungen der ersten Generation.....	20
3.4.3.2	Verbindungen der zweiten Generation .....	21
3.4.3.3	Verbindungen der dritten Generation.....	23
3.4.4	Ansätze zur weiteren Verbesserung von künstlichen Nukleasen.....	25
<b>4.</b>	<b><i>MOLEKULARE ERKENNUNG IN DER KLEINEN FURCHE</i></b> .....	<b>27</b>
4.1	Hintergründe und Evolution .....	27
4.2	Weiterführende Experimente.....	33
4.2.1	Unterdrückung der Gen-Expression .....	33
4.2.2	Verstärkung der Gen-Expression.....	35
4.2.3	DNA-Alkylierung .....	36
4.2.4	Polyamid-Trafficking .....	36
<b>5.</b>	<b><i>ZIELSETZUNG</i></b> .....	<b>37</b>
<b>6.</b>	<b><i>SYNTHETISCHE ARBEITEN UND RESULTATE</i></b> .....	<b>39</b>
6.1	Synthese des DNA-Spalters .....	39
6.1.1	Synthesestrategie 1.....	40
6.1.1.1	Planung .....	40
6.1.1.2	Durchführung.....	42
6.1.2	Synthesestrategie 2.....	45
6.1.2.1	Planung .....	45
6.1.2.2	Durchführung.....	46
6.1.3	Synthesestrategie 3.....	46
6.1.3.1	Planung .....	46
6.1.3.2	Durchführung.....	47
6.1.4	Synthesestrategie 4.....	47
6.1.4.1	Planung .....	47
6.1.4.2	Durchführung.....	48
6.1.5	Synthesestrategie 5: Veränderung des Substitutionsmusters des Edukts .....	48
6.1.5.1	Planung .....	48
6.1.5.2	Durchführung.....	49

<b>6.2</b>	<b>Synthese des Hairpin-Polyamides .....</b>	<b>62</b>
6.2.1	Strategie 1.....	62
6.2.1.1	Planung.....	64
6.2.1.2	Durchführung .....	67
6.2.2	Strategie 2.....	74
6.2.2.1	Planung.....	74
6.2.2.2	Durchführung .....	76
6.2.3	Strategie 3.....	81
6.2.3.1	Planung.....	81
6.2.3.2	Durchführung .....	82
<b>6.3</b>	<b>Kinetik-Messung.....</b>	<b>90</b>
<b>7.</b>	<b>IN VITRO-EXPERIMENTE MIT DNA .....</b>	<b>93</b>
<b>7.1</b>	<b>Experimente zu den Bindungseigenschaften von Polyamiden im Komplex mit DNA.....</b>	<b>93</b>
7.1.1	Charakterisierung mit MALDI-MS .....	94
7.1.2	Bindungs-Experimente mit ESI-MS .....	94
7.1.3	Bindungs-Experimente mit LILBID-MS .....	97
<b>7.2</b>	<b>Experimente zur Orientierung des Polyamids im Komplex mit DNA .....</b>	<b>99</b>
<b>7.3</b>	<b>Experimente zur DNA-Spaltung.....</b>	<b>103</b>
7.3.1	Allgemeine experimentelle Bedingungen.....	104
7.3.2	Vorversuch und Vergleich mit anderen Spaltreagenzien .....	106
7.3.3	Reaktion mit dem Bisguanidinium-Alkohol 45.....	108
7.3.3.1	pH-Abhängigkeit der Plasmid-Spaltung.....	113
7.3.3.2	Kurzzeit-Kinetik.....	118
7.3.3.3	Einfluss von Sauerstoff auf die Spaltung .....	121
7.3.3.4	Einfluss von Metall-Ionen auf die DNA-Spaltung .....	123
7.3.3.5	Identifizierung von präferierten Spaltstellen .....	128
7.3.3.6	Stabilitätsuntersuchungen in HEPES-Puffer .....	129
7.3.4	Reaktion mit der Bisguanidinium-Carbonsäure 94 .....	131
7.3.5	Reaktion mit dem Bisamin 95 .....	133
7.3.5.1	pH-Abhängigkeit der Plasmid-Spaltung.....	135
7.3.5.2	Einfluss von Metall-Ionen auf die DNA-Spaltung .....	140
7.3.6	Reaktion mit dem Bisperimidin 97 .....	144
7.3.7	Einfluss von Apurin-Stellen auf die DNA-Spaltung von 45 und 95.....	147
7.3.8	Reaktion mit dem Polyamid-Bisamin 140.....	150
7.3.8.1	Konzentrationsabhängigkeit der Plasmid-Spaltung durch 140 .....	153
7.3.9	Reaktion mit dem Polyamid-Bisguanidin 46.....	157
7.3.9.1	pH-Abhängigkeit der Plasmid-Spaltung.....	160
7.3.9.2	Kurzzeit-Kinetik.....	163
7.3.9.3	Langzeit-Kinetik .....	166
7.3.9.4	Einfluss von Metall-Ionen auf die DNA-Spaltung .....	168
<b>8.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>173</b>
<b>9.</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>179</b>
<b>10.</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>183</b>
<b>10.1</b>	<b>Allgemeine experimentelle Bedingungen.....</b>	<b>183</b>
<b>10.2</b>	<b>Allgemeine synthetische Vorschriften.....</b>	<b>186</b>
<b>10.3</b>	<b>Zur Nomenklatur der synthetisierten Verbindungen .....</b>	<b>186</b>
<b>10.4</b>	<b>Liste der synthetisierten Verbindungen .....</b>	<b>188</b>
<b>10.5</b>	<b>Reaktionsvorschriften.....</b>	<b>190</b>
10.5.1	2,6-Dibromo-4-methylanilin (83).....	190
10.5.2	2,6-Dicyano-4-methylanilin (84) .....	191

10.5.3	3,5-Dicyano-4-iodtoluol (81) .....	192
10.5.4	3,5-Dicyano-4-iodbenzoesäure (59) .....	196
10.5.5	3,5-Dicyano-4-iodbenzoesäuremethylester (50) .....	197
10.5.6	Naphtho-1,8-diol (90) .....	198
10.5.7	4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-dicyanobenzoessäuremethylester (86) .....	200
10.5.8	4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-( <i>tert</i> butoxycarbonylamino-methyl)-benzoesäuremethylester (87) .....	201
10.5.9	4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-[(4'',5''-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-benzoesäuremethylester (45) .....	203
10.5.10	4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-[(4'',5''-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-benzoesäure (94) .....	206
10.5.11	4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-[(2''-perimidinylamino)-methyl]-benzoesäuremethylester (97) .....	208
10.5.12	4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-(aminomethyl)-benzoesäuremethylester (95) .....	210
10.5.13	4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-( <i>tert</i> butoxycarbonylamino-methyl)-benzoesäure (88) .....	212
10.5.14	4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-sulfonsäure (93) .....	214
10.5.15	2-Trichloracetyl-1-methylpyrrol (99) .....	216
10.5.16	4-Nitro-2-trichloracetyl-1-methylpyrrol (100) .....	217
10.5.17	4-Nitro-1-methylpyrrol-2-carbonsäure- <i>tert</i> -butylester (125) .....	218
10.5.18	2-Trichloracetyl-1-methylimidazol (103) .....	219
10.5.19	$\gamma$ -Aminobutansäuremethylester Hydrochlorid (110) .....	220
10.5.20	O <sub>2</sub> N-Py- $\gamma$ -OMe (111) .....	222
10.5.21	O <sub>2</sub> N-Py-Py- $\gamma$ -OMe (112) .....	223
10.5.22	Im-Py-Py- $\gamma$ -OMe (113) .....	225
10.5.23	Im-Py-Py- $\gamma$ -OH (114) .....	226
10.5.24	O <sub>2</sub> N-Py-Py-O <sup>t</sup> Bu (126) .....	228
10.5.25	O <sub>2</sub> N-Py-Py-Py-O <sup>t</sup> Bu (127) .....	230
10.5.26	O <sub>2</sub> N-Py-Py-Py-OH (128) .....	231
10.5.27	3-( <i>tert</i> -Butyloxycarbonylamino)propyl-3'-aminopropyl-N-methylamine (133) .....	233
10.5.28	3-(Benzyloxycarbonylamino)-propionsäure-(3-(N-methyl-N-(3- <i>tert</i> -butyl oxycarbonylamino)propyl)-aminopropyl)-amid (134) .....	234
10.5.29	4-( <i>tert</i> -Butyloxycarbonylamino)-N-(3'-{[3''-(3'''-benzyloxycarbonylamino-propionylamino)-propyl]-methyl-amino}-propyl)butansäureamid (135) .....	236
10.5.30	O <sub>2</sub> N-Py-Py-Py- $\beta$ -C <sub>3</sub> -N(Me)-C <sub>3</sub> - $\gamma$ -Boc (137) .....	238
10.5.31	Im-Py-Py- $\gamma$ -Py-Py-Py- $\beta$ -C <sub>3</sub> -N(Me)-C <sub>3</sub> - $\gamma$ -Boc (138) .....	240
10.5.32	Im-Py-Py- $\gamma$ -Py-Py-Py- $\beta$ -C <sub>3</sub> -N(Me)-C <sub>3</sub> - $\gamma$ -DABCYL (141) .....	243
10.5.33	Im-Py-Py- $\gamma$ -Py-Py-Py- $\beta$ -C <sub>3</sub> -N(Me)-C <sub>3</sub> - $\gamma$ -87 (139) .....	245
10.5.34	Im-Py-Py- $\gamma$ -Py-Py-Py- $\beta$ -C <sub>3</sub> -N(Me)-C <sub>3</sub> - $\gamma$ -95 (140) .....	248
10.5.35	Im-Py-Py- $\gamma$ -Py-Py-Py- $\beta$ -C <sub>3</sub> -N(Me)-C <sub>3</sub> - $\gamma$ -45 (46) .....	250
<b>10.6</b>	<b>Kinetik-Messung: Umsetzung von 45 mit 35 .....</b>	<b>252</b>
10.6.1	Allgemeines .....	252
10.6.2	Kalibrierung und Bestimmung der Eichfaktoren .....	254
10.6.2.1	Herstellung der Maßlösung des internen Standards 144 .....	254
10.6.2.2	Eichung von 4-Nitrophenol .....	254
10.6.2.3	Eichung vom Bisguanidiniumalkohol 45 .....	255
10.6.2.4	Bestimmung der Eichfaktoren .....	256
10.6.3	Reaktion von 45 mit BNPP 35 unter wasserfreien Bedingungen .....	257
<b>11.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>263</b>
<b>11.1</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>263</b>
<b>11.2</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>266</b>



## 1. EINLEITUNG

Das klassische Forschungsgebiet der organischen Chemie beinhaltet u.a. die Entwicklung neuer Synthese-Methoden für den Aufbau bisher unzugänglicher Struktur motive, die enantioselektive Katalyse von verschiedenartigen Reaktionen und die Totalsynthese diverser Naturstoffe. Anfänglich diente die Totalsynthese zur Strukturaufklärung, und sogar heute gibt es noch Fälle, in denen die stereochemischen Verhältnisse einer Substanz trotz moderner Analysemethoden wie Kernresonanzspektroskopie und Röntgenstrukturanalyse erst durch die erfolgreiche Totalsynthese zweifelsfrei bestimmt werden können<sup>[1]</sup>.

Die vergangene und die weiterhin andauernde Forschung auf den genannten und weiteren Gebieten hat schon sehr viele nützliche Reaktionstypen hervorgebracht, die den Aufbau von sehr komplexen Molekülen ermöglicht haben. Man könnte von einer *Toolbox* der Reaktionen sprechen, zu der permanent neue Werkzeuge hinzugefügt bzw. bereits vorhandene verbessert werden.

Die große Vielfalt synthetischer Methoden erlaubt es auch, speziell designte Moleküle für diverse Zwecke herzustellen. So kann die organische Chemie auch für angrenzende wissenschaftliche Gebiete wie z.B. die Biologie und die Biotechnologie wertvolle Werkzeuge liefern, die andernfalls nicht vorhanden wären. Ebenso macht die organische Synthese neue in der Natur nicht oder nur sehr begrenzt vorkommende Wirkstoffe zugänglich, die beispielsweise für Chemotherapien eingesetzt werden können.

Ein Teilgebiet, auf das hier und in Kapitel 2 besonders eingegangen werden soll, ist die Manipulation der Desoxyribonukleinsäure (engl. Abkürzung: DNA), des Speichermoleküls aller genetischen Informationen von Lebewesen. Die DNA steht schon seit ihrer Entdeckung im Fokus der Forschung, und das Interesse daran ist bis heute nicht abgerissen. Dieser Fakt wird durch einen Blick in die (neu erscheinende) Literatur eindrucksvoll unterstrichen.

So beruhen sehr viele Prozesse in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen auf der Spaltung oder Knüpfung von Phosphodiestern, die sowohl in DNA als auch in RNA vorkommen. Zu den Enzymen mit DNA-spaltenden Eigenschaften gehören u.a. die Topoisomerasen, die Phosphodiesterasen und die Restriktionsendonucleasen. Diese Enzyme stellen allesamt hochspezialisierte und -molekulare organische Moleküle dar, die allerdings nur bei ganz speziellen Bedingungen optimal funktionieren. Die bereits erwähnten Analysemethoden haben –neben anderen- dazu beigetragen, die mechanistische Wirkungsweise von vielen Enzymen aufzuklären. Auf Grund dieses Verständnisses könnte man versuchen, ein solches Molekül strukturvereinfacht synthetisch herzustellen.

Die Grundidee ist ein großes Molekül wie ein Enzym auf die wesentlichen Eigenschaften zu reduzieren und diese in einem kleinen Molekül zu vereinen. Damit hätte man ein Enzymmimetikum (und damit eine künstliche Nuklease) geschaffen, für das es viele

Anwendungsmöglichkeiten gäbe. Vor allem könnte man die Spezifität so auch auf DNA-Sequenzen einstellen, für die es keine natürlichen Nukleasen gibt.

Die Entwicklung und Herstellung künstlicher Nukleasen gehört schon seit geraumer Zeit zu den Arbeits- und Interessengebieten der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. M. W. Göbel.

Die Synthese von Molekülen mit Phosphodiester-spaltenden Eigenschaften ist in der Vergangenheit auch schon durchgeführt worden, wobei man die Spaltfähigkeit von Phosphodiestern zunächst mit reaktiven Modellphosphaten untersucht hat, bevor man schließlich in der dritten Generation dieser Moleküle eine so reaktive Verbindung gefunden hat, die auch die sehr unreaktiven Phosphodiesterbindungen der DNA spalten kann. Keines der bis jetzt hergestellten Moleküle besitzt jedoch eine Sequenzspezifität, weil man sich zunächst auf die notwendige Reaktivität fokussiert hat. Die Evolution dieser Verbindungen wird in Kapitel 3.4 näher erläutert.

Um sequenzspezifische Reaktionen zu erhalten und zu untersuchen, benötigt man ein Trägermolekül, welches in der Lage ist, DNA-Sequenzen selektiv zu erkennen. Hierfür kommen prinzipiell mehrere literaturbekannte Ansätze in Frage. Die in der Arbeitsgruppe von Peter B. Dervan entwickelten Polyamide, die in Kapitel 4 näher vorgestellt werden, sind die derzeit erfolgreichsten spezifischen niedermolekularen DNA-Liganden und sollten sich für das angedachte Projekt hervorragend eignen.

In dieser Dissertation wird die weitere Entwicklung einer hoch aktiven, metallfreien Phosphodiester-spaltenden Verbindung auf dem Weg zu einer künstlichen Nuklease beschrieben.

## 2. STRUKTURELLE CHARAKTERISTIKA DER DNA

Das vorliegende Kapitel soll dazu dienen, die Eigenschaften der DNA wie z.B. Bausteine, Struktur, Konformation und Funktion kurz zu beleuchten. Diese Daten bilden die Grundlage, um tiefer in die recht speziellen Themen wie *Phosphoryltransfer*, *Enzymmimetika* und *Molekulare Erkennung von DNA* einsteigen zu können.

### 2.1 Allgemeines

Bei den Nukleinsäuren werden die folgenden zwei Klassen unterschieden:

- Desoxyribonukleinsäure (DNA) und
- Ribonukleinsäure (RNA)

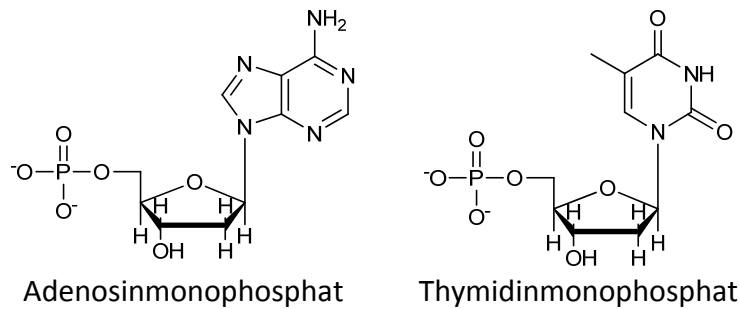
Auf der DNA sind die Erbinformationen aller zellulären Lebensformen gespeichert; sie dient als molekularer Träger und hat zwei zentrale Funktionen:

- 1) Steuerung der eigenen Replikation während der Zellteilung sowie
- 2) Steuerung der Transkription der komplementären RNA-Moleküle.

Die RNA unterscheidet sich in einigen Punkten von DNA und hat vielfältige biologische Funktionen, auf die aber hier nicht näher eingegangen wird. Es soll aber erwähnt sein, dass die An- bzw. Abwesenheit einer einzigen OH-Gruppe an der Ribose u.a. einen drastischen Einfluss auf die Nukleinsäurespaltung hat. Dies wird in Kapitel 3 näher beschrieben.

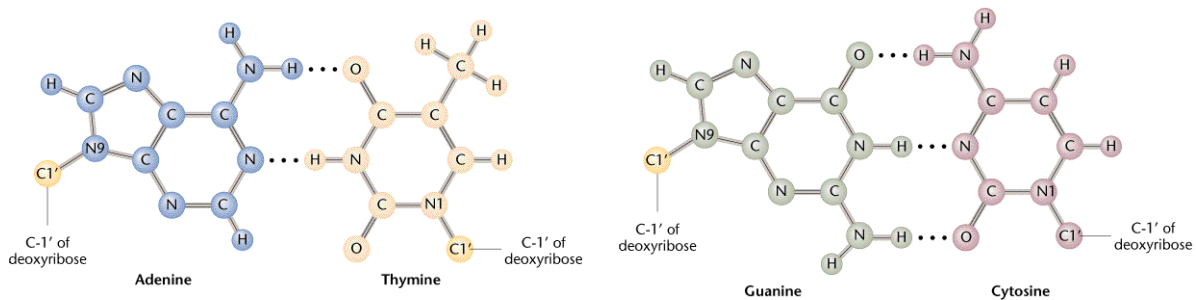
### 2.2 Die Bausteine der DNA

Die Aufklärung der chemischen Zusammensetzung der Nukleinsäuren wurde durch die Arbeiten von P. Levine und A. Todd ermöglicht. Man fand heraus, dass Nukleinsäuren lineare Polymere von Nukleotiden sind, deren Phosphat-Reste die 3'- und 5'-Positionen aufeinander folgender Desoxyribose-Moleküle verbinden. Ein Nukleotid ist hierbei definiert als eine Einheit von einer Nukleobase, einem Ribose-Derivat und einem Phosphat-Rest:



**Abbildung 2-1:** Exemplarische Darstellung der Moleküle Adenosin- und Thymidinmonophosphat zur Verdeutlichung des Begriffs Nukleotid: die Moleküle beinhalten Ribose, eine Phosphatgruppe am 5'-OH und Adenin bzw. Thymin als Nukleobase an C1' des Zuckers

Jeweils 2 der 4 Nukleobasen (Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin) bilden dabei ein sogenanntes Basen-Paar (was auch Watson-Crick-Basenpaarung genannt wird): Adenin-Thymin (A-T) bzw. Thymin-Adenin (T-A) und Guanin-Cytosin (G-C) bzw. Cytosin-Guanin (C-G):



**Abbildung 2-2:** Die Watson-Crick-Basenpaare mit Darstellung der Wasserstoff-Brücken. Der Bereich oberhalb der Basenpaare bildet in der Doppelhelix die große Furche (*major groove*); unterhalb ist die kleine Furche (*minor groove*) zu finden.

Zusammenfassend war also bekannt:

- die DNA besteht aus vielen Untereinheiten, die Nukleotide genannt werden
- jedes Nukleotid enthält einen Zucker, ein Phosphat und eine Nukleobase
- DNA beinhaltet vier verschiedene Nukleobasen
  - Adenin (ein Purin)
  - Cytosin (ein Pyrimidin)
  - Guanin (ein Purin)
  - Thymin (ein Pyrimidin)
- die Anzahl der Purine ist gleich der Anzahl der Pyrimidine
- die Anzahl der Adenine ist gleich der Anzahl der Thymine
- die Anzahl der Cytosine ist gleich der Anzahl der Guanine

Wie die Nukleinsäuren nun aber genau aussahen wusste man weiterhin nicht.



## 2.3 Struktur und Konformation von DNA-Duplexen

Im Jahre 1953 gelang es J. Watson und F. Crick, die Struktur der DNA aus Daten von Röntgenbeugungsexperimenten aufzuklären und die helikale Struktur der DNA nachzuweisen.

Sie kombinierten das Wissen über die chemische Zusammensetzung mit den Daten aus den Röntgenbeugungsexperimenten und publizierten ihre Erkenntnis, dass die DNA eine Doppelhelix bildet<sup>[2]</sup>. Für diese Leistung erhielten sie 1962 den Nobelpreis zusammen mit M. H. F. Wilkins.

Mit der Aufklärung der Struktur der DNA war das Interesse der Wissenschaft an dem Molekül noch lange nicht erloschen. Weitere Experimente folgten und andere Wissenschaftler lieferten den Beweis, dass die DNA in Abhängigkeit von Wassergehalt und Salzkonzentration verschiedene Konformationen einnehmen kann<sup>[3]</sup>. Die verschiedenen Konformationen sollen hier kurz vorgestellt und deren geometrische Daten in *Tabelle 2-1* zusammengefasst werden.

### 2.3.1 Die B-DNA

Die native Form ist die B-DNA mit  $\text{Na}^+$  als Gegen-Ion und einer relativen Feuchtigkeit von 92 %. Sie besteht aus zwei antiparallelen Nukleotidketten, die sich rechtsgängig um eine gemeinsame Achse drehen und somit eine Doppelhelix bilden. Die Nukleobasen befinden sich auf der Innenseite der Helix, während die Phosphat-Zucker-Ketten die Peripherie bilden. Die Nukleobasen bilden -wie oben beschrieben- Paare, die annähernd senkrecht zur Helixachse angeordnet sind. Diese komplementäre Basenpaarung beruht auf der Ausbildung von 2 (A-T / T-A) bzw. 3 (C-G / G-C) Wasserstoffbrücken. Eine komplette Windung enthält 10 Basenpaare.

Ein weiteres Strukturmerkmal sind die beiden Furchen: die kleine Furche (*minor groove*) und die große Furche (*major groove*). Sie sind beide von besonderem Interesse, weil sie zentrale Orte vieler biologischer Prozesse sind. Die kleine Furche soll in dieser Arbeit aber von besonderer Wichtigkeit sein, wie in Kapitel 4 noch verdeutlicht wird.

### 2.3.2 Die A-DNA

Wird die relative Feuchtigkeit auf 75 % gesenkt, findet eine Konformationsänderung in die A-DNA statt. Sie bildet ebenso wie die B-DNA eine rechtsgängige Helix, die allerdings breiter

und flacher ist als bei der B-Form. Eine Folge davon ist, dass eine komplette Windung nun 11 Basenpaare enthält und die Basen ein wenig gegen die Helixachse geneigt sind. Die Konformationsänderung wirkt sich auch auf die Furchen aus: die große Furche ist nun extrem tief, die kleine Furche extrem flach.

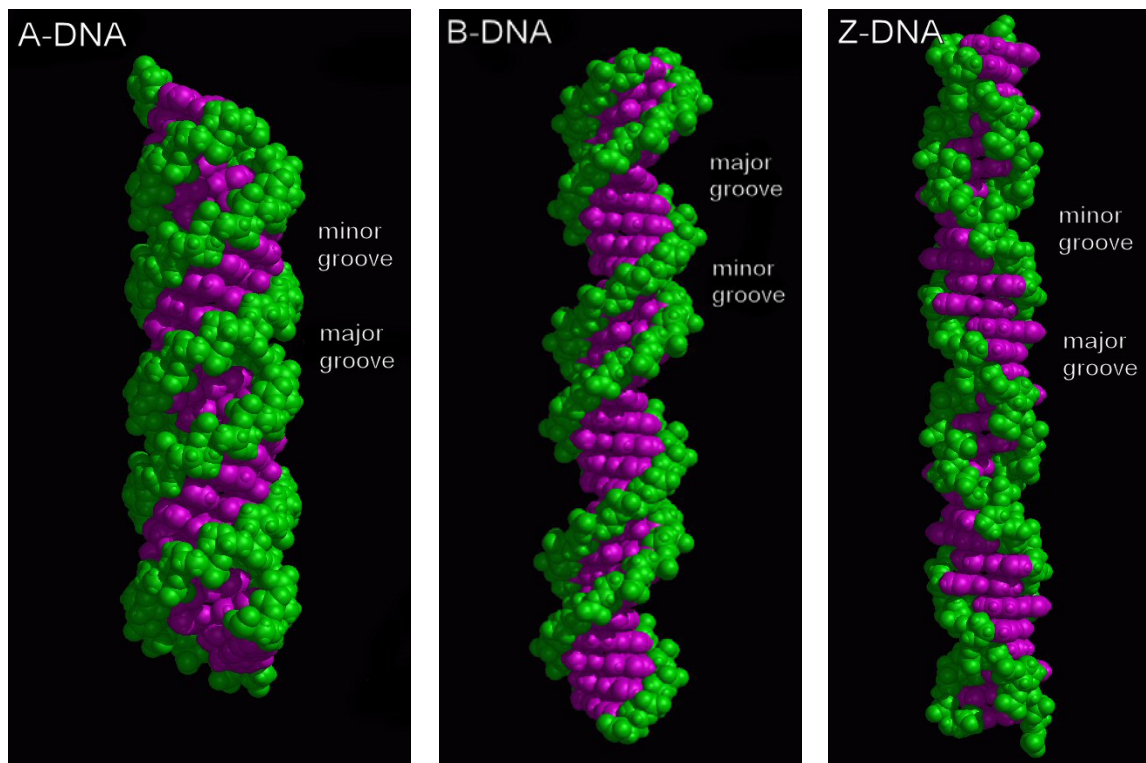
### 2.3.3 Die Z-DNA

A. Wang und A. Rich wiesen bei der Röntgenstrukturanalyse eines Oligomers eine linksgängige Helix nach. Diese auch Z-DNA genannte Konformation beinhaltet 12 Basenpaare pro Helixwindung, eine tiefe kleine Furche und eine extrem flache große Furche. Die Z-DNA wird besonders bei hohen Salzkonzentrationen gegenüber der B-DNA stabilisiert, bildet sich aber nur bei speziellen Basensequenzen wie z.B. poly-G/C.

Die einzelnen DNA-Konformationen inklusive deren geometrischen Eigenschaften sind zur allgemeinen Übersicht in *Tabelle 2-1* aufgelistet:

**Tabelle 2-1:** Übersicht über verschiedene Eigenschaften der 3 DNA-Konformere

<b>DNA-Typ</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>Z</b>
helicaler Drehsinn	rechtsgängig	rechtsgängig	linksgängig
Durchmesser	~ 2.6 nm	~ 2 nm	~ 1.8 nm
Basenpaare pro helicaler Windung	11	10	12 (6 Dimere)
Basenneigung zur Helixachse	20°	6°	7°
helikale Windung pro Basenpaar	33°	36°	60°
Anstieg pro Windung	2.8 nm	3.4 nm	4.5 nm
Große Furche	eng und tief	breit und tief	flach
Kleine Furche	breit und flach	eng und tief	eng und tief
Ribose-Konformation	C(3')-endo	C(2')-endo	C <sup>2'</sup> -endo für Pyr C <sup>3'</sup> -endo für Pur



**Abbildung 2-3:** Kalottenmodelle der verschiedenen Strukturen von A-, B- und Z-DNA<sup>[1]</sup>. Grün ist das Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat dargestellt und violett die Nukleobasen.

<sup>1</sup> [http://www.imb-jena.de/image\\_library/DNA/DNA\\_models/](http://www.imb-jena.de/image_library/DNA/DNA_models/)



### 3. PHOSPHORYLTRANSFER UND ENZYMMIMETIKA

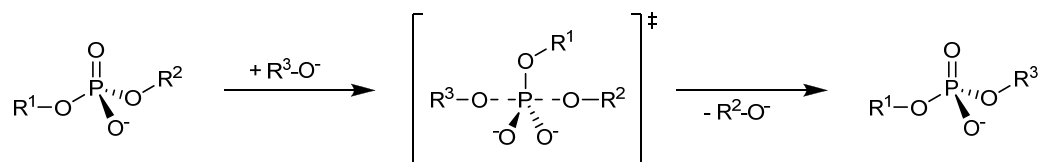
Im Folgenden sollen vor allem die Phosphorsäurediester im Mittelpunkt stehen, die -wie in Kapitel 2.2 dargestellt- die verknüpfenden Einheiten zwischen 2 Nucleosiden darstellen<sup>[4]</sup> (auf Phosphorsäuremonoester und Pyrophosphate soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden). So soll zunächst auf den Mechanismus der Phosphoryltransfer-Reaktion eingegangen werden, um die notwendigen Grundlagen zur Bewertung der enzymatischen Katalyse bereitzustellen. Aus diesen Erkenntnissen werden dann Wege zur Synthese von künstlichen Nukleasen abgeleitet.

#### 3.1 Mechanistische Aspekte der Phosphoryltransfer-Reaktionen

Der Bruch und das erneute Verknüpfen von Phosphorsäureestern (also die Phosphoryltransfer-Reaktion, welche eine Substitution an einem Phosphorsäure-Derivat bezeichnen soll) ist Bestandteil vieler fundamentaler biochemischer Prozesse. Dazu gehören -unter vielen anderen- Replikation, Transkription und die Umwandlung von DNA-Topoisomeren.

Diese Substitutionsreaktionen sind -unkatalysiert- jedoch extrem langsame Reaktionen (man hat für die spontane Hydrolyse eine Halbwertszeit von 200 Mio. Jahren bei 25 °C und pH 7 berechnet<sup>[5]</sup>); die Phosphorsäurediester sind im Umkehrschluss also von sehr hoher Stabilität (was auch eine unabdingbare Eigenschaft für einen genetischen Informationsträger ist).

Die Ursache für diese Reaktionsträgheit soll hier kurz beleuchtet werden: in einem für Phosphorsäurediester angenommenen S<sub>N</sub>2-artigen Mechanismus<sup>[6,7,8,9,10]</sup> besteht der erste Schritt im nucleophilen Angriff eines Anions an einen tetraedrischen und ebenso anionischen Phosphorsäurediester, was schon durch elektrostatische Repulsion ungünstig ist. Weiterhin führt dieser Schritt zur Ausbildung eines zweifach negativ geladenen Übergangszustandes, der geometrisch mit einer trigonalen Bipyramide beschrieben werden kann.



**Abbildung 3-1:** Schematische Darstellung einer Substitutionsreaktion an einem tetraedrisch koordinierten Phosphor(V)-diester; die gestrichelten waagerechten Linien symbolisieren die Bindungen zum Nucleophil bzw. zur Abgangsgruppe.

Die apicalen Positionen der Bipyramide werden hierbei einerseits vom Nucleophil (R<sup>3</sup>O) und andererseits von der Abgangsgruppe (R<sup>2</sup>O) besetzt, während die unsubstituierten Sauerstoffe

eine äquatoriale Anordnung einnehmen. Die negativen Ladungsschwerpunkte kommen sich hier sowohl beim Angriff als auch im Übergangszustand recht nahe, was die Begründung für die Reaktionsträgheit darstellt. Der Vollständigkeit halber soll noch erwähnt werden, dass die Reaktivität der Phosphodiester vom Protonierungsgrad abhängig ist. Für die weiteren Betrachtungen soll aber vom deprotonierten Zustand (wie beim physiologischen pH von  $\sim 7$ ) ausgegangen werden.

## 3.2 Enzymatische Katalyse der Phosphoryltransfer-Reaktionen

Wie in Kapitel 2 erwähnt, ist die Stabilität der Phosphodiester für einen genetischen Informationsträger eine essentielle Voraussetzung (Versuche mit 1 M NaOH bei 50 °C haben keine messbare Hydrolyse gezeigt<sup>[11]</sup>). Doch auch diese Verbindungen müssen im Zuge diverser biochemischer Prozesse gespalten und neu verknüpft werden. Zu diesem Zweck gibt es spezialisierte Enzyme, die genau diesen Phosphoryltransfer zum Einen energetisch bzw. mechanistisch möglich machen (und dabei für gewöhnlich  $C^{5'}$ -O-Phosphate liefern) und zum Anderen in eine akzeptable Zeitskala rücken. Es soll nun kurz beschrieben werden, wie dieses Problem prinzipiell durch Enzyme gelöst wird:

Zunächst einmal muss das im obigen Abschnitt beschriebene anionische Nucleophil generiert werden. Hierzu kann eine Brönstedt-Base wie z.B. der Imidazol-Ring von Histidin (evtl. in Kombination mit einer Lewis-Säure -wie beispielsweise einem Metall-Kation- die den  $pK_a$  des Nucleophils senkt) dienen, die ein geeignetes Proton vom Nucleophil abstrahiert. Durch diese Reaktion wird die Nucleophilie drastisch erhöht.

Der ungünstige, anionische Übergangszustand kann durch Lewis-Säuren, aber auch durch Wasserstoffbrücken-Donoren wie dem Guanidinium-Kation stabilisiert werden, indem die negative Ladung (teilweise) kompensiert wird. Dies senkt die Energiebarriere wiederum etwas ab.

Die Abgangsgruppe wird wiederum durch eine geeignete Brönstedt-Säure -wie z.B. einem Imidazolium-Kation von Histidin- protoniert, um ein elektrisch neutrales Molekül zu erhalten. Diese drei Punkte sorgen dafür, dass Phosphoryl-Übertragungsreaktionen in biologischen Systemen enzymkatalysiert wesentlich schneller verlaufen als im unkatalysierten Fall.

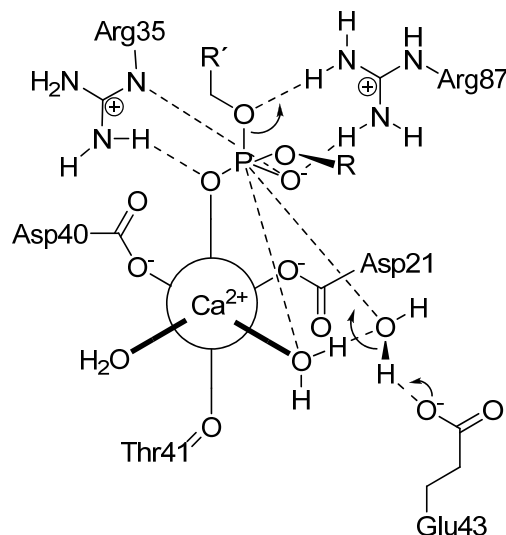
### 3.3 Klassifikation von Phosphodiester-spaltenden Enzymen

Die Enzyme, welche im chemischen Sinne<sup>[II]</sup> auch als Phosphodiesterasen bezeichnet werden können und die Phosphoryltransfer-Reaktion katalysieren, lassen sich für den hier betrachteten Zweck in 2 Kategorien einordnen, wobei jeweils ein Beispiel etwas näher beschrieben wird.

#### 3.3.1 Metallhaltige Enzyme

Die Enzyme dieser Kategorie können s- und d-Block-Elemente enthalten (Ca, Mg, Mn, Fe, Co, Ni, Zn), wobei die Metalle des d-Blocks häufiger vertreten sind<sup>[12]</sup>. Interessant ist hierbei, dass die enzymatische Spaltung 5'-Phosphate liefert, und keine 3'-Phosphate<sup>[13]</sup>. Zu den Vertretern dieser Klasse gehören u.a. die Alkalische Phosphatase, die Ribonuclease H, die violette Phosphatase und die Staphylokokkennuklease.

Letztere wird zu den Hydrolasen gezählt und verwendet im aktiven Zentrum ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion (und damit ein s-Block-Element) als Cofaktor. Dieses Metall-Kation ist oktaedrisch von Asp21, Asp40, dem Amid-Carbonyl-O-Atom von Thr41, einem Phosphodiester-O-Atom des Substrates und 2 Wassermolekülen komplexiert<sup>[14]</sup>.



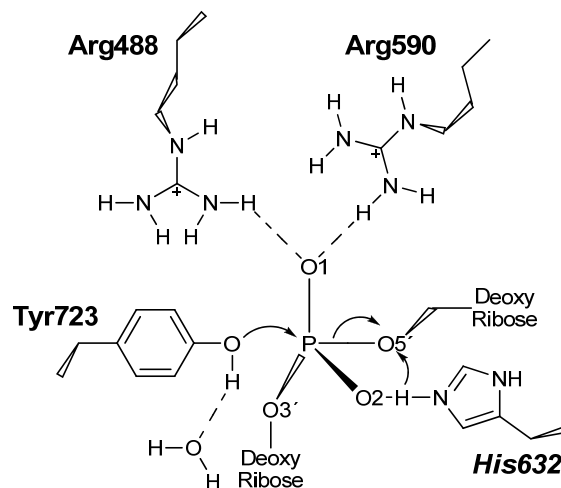
**Abbildung 3-2:** Darstellung des aktiven Zentrums der Staphylokokkennuklease. Zentral ist das zweifach positive Ca-Kation dargestellt, das oktaedrisch koordiniert ist, und an das auch der Phosphoester gebunden ist (Abbildung gezeichnet nach Vorlage aus [14]).

<sup>II</sup> Im biochemischen Sinne wird der Begriff Phosphodiesterase hauptsächlich mit der Spaltung von cAMP und cGMP in Verbindung gebracht.

Die  $\text{PO}_4$ -Gruppe steht im Kontakt zu Arg35 und Arg87, welche als kationische Wasserstoffbrücken-Donoren die negative Ladung des Phosphates kompensieren. Als Nucleophil kommen die beiden Wasserliganden des  $\text{Ca}^{2+}$  in Frage, wobei eines davon so positioniert ist, dass es von Glu43 deprotoniert werden kann<sup>[15]</sup>. Dieses Molekül kann sowohl RNA als auch DNA spalten und beschleunigt die Phosphodiesterhydrolyse um 16 Zehnerpotenzen.

### 3.3.2 Metallfreie Enzyme

Neben den metallhaltigen Enzymen kommen in biologischen Systemen auch metallfreie Katalysatoren vor. Als wichtiges Beispiel dient hier die Topoisomerase I. Ihre Funktion besteht in der Veränderung der Superhelizität des DNA-Duplexes, was bei einigen biochemischen Prozessen wie z.B. Replikation, Transkription, Rekombination und Chromatin-Remodeling von Bedeutung ist.



**Abbildung 3-3:** Darstellung des aktiven Zentrums der Topoisomerase Typ I mit angelagertem Substrat. Durch unterbrochene Linien sind Wasserstoff-Brücken in der Zeichnung angedeutet (Abbildung analog zu [17]).

Das aktive Zentrum der humanen Typ-I-Topoisomerase enthält neben dem katalytisch aktiven Tyr723 noch drei Aminosäuren, die das Phosphat binden: Lys532, Arg488 und Arg590. Sie stabilisieren zusammen mit His632 -welches auch noch die Abgangsgruppe protoniert- den anionischen Übergangszustand<sup>[16,17]</sup>.



### 3.4 Künstliche Spalter von Phosphodiestern

Die Darstellung von künstlichen Phosphodiester-Spaltern, welche strukturell wesentlich einfacher aufgebaut und dazu weniger anhängig vom Lösungsmittel Wasser sind als ihre biologischen Vorbilder, ist seit geraumer Zeit ein aktiv bearbeitetes Forschungsfeld.

Für diese Moleküle gäbe es sehr viele Einsatzgebiete:

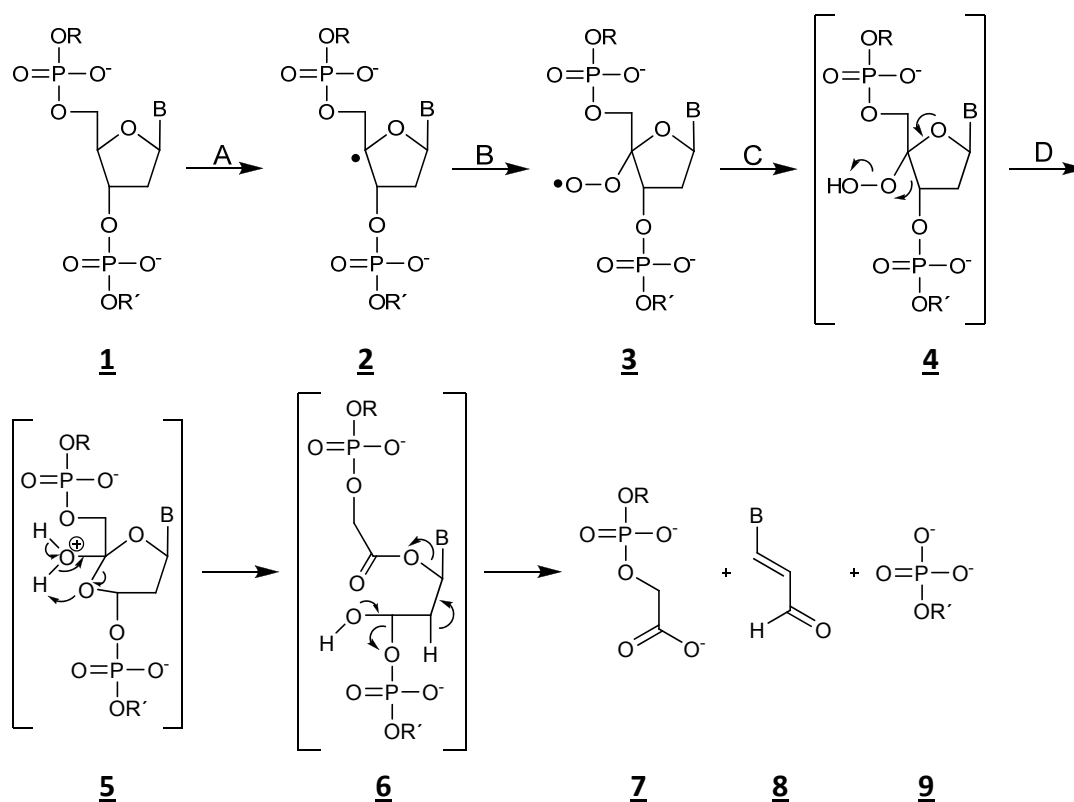
- als biomimetische Systeme, um den Mechanismus eines entsprechenden Restriktionsenzym aufzuklären,
- als maßgeschneiderte künstliche Restriktionsenzyme,
- als Footprinting-Reagenzien,
- als Entgiftungsmittel für Pestizide bzw. generell Substanzen, die Phosphatester enthalten und
- als antibiotisches oder chemotherapeutisches Medikament.

Die mögliche Verwendung von Metall-Ionen für diese Verbindungen eröffnet dabei zwei prinzipielle Wege, die entweder zu metallhaltigen oder zu metalfreien Modellen führt. Diese beiden Ansätze sollen im Folgenden kurz an einigen Beispielen vorgestellt werden (eine vollständigere Aufstellung ist in der Literatur verfügbar<sup>[18,19,20]</sup>).

#### 3.4.1 Metallhaltige Modelle

Eingangs sei erwähnt, dass der Einsatz von Metallionen neben dem hydrolytischen Weg der Spaltung potentiell auch noch einen oxidativen Weg eröffnet. Die oxidative Spaltung der DNA führt durch Modifikationen am Zucker zu irreversiblen Schäden und Abbau der DNA<sup>[21,22]</sup>. Der Mechanismus dieses Abbaus soll hier am Beispiel des Zytostatikums Fe(II)\*Bleomycin kurz dargestellt werden:

Der Komplex aus Fe(II) und Bleomycin bindet an die *minor groove* der DNA und wird durch molekularen Sauerstoff oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert. Durch dieses Radikal wird zunächst am C<sup>4'</sup> von **1** ein H-Atom abstrahiert, wodurch das Radikal **2** entsteht. Dieses reagiert weiter mit O<sub>2</sub>, einem Elektron und einem Proton zum Intermediat **4**, welches in zwei Schritten unter weiterer Anlagerung eines Wasser-Moleküls in **6**, in das Nukleobasen-Propenal **7** und das Oligonukleotid-5'-phosphat **8** zerfällt.



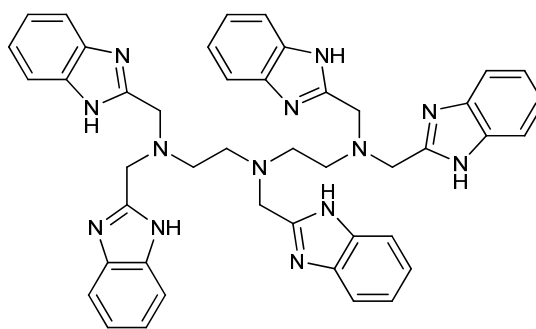
**Abbildung 3-4:** Von Worth *et al.* und Hecht vorgeschlagener Reaktionsmechanismus des DNA-Abbaus durch Fe(II)\*Bleomycin-induzierte C<sup>4'</sup>-H-Abstraktion. (A) „aktiviertes Bleomycin“, (B) O<sub>2</sub>, (C) e<sup>-</sup>, H<sup>+</sup>, (D) -OH<sup>-</sup>, +H<sub>2</sub>O.

Wie man *Abbildung 3-4* entnehmen kann, wird bei dieser Reaktion die Desoxyribose irreversibel unter Verlust einer Nukleobase zerstört. Eine Re-Ligation ist daher nicht mehr möglich.

Dieser Effekt ist für ein reversibel hydrolytisches Mimetikum unerwünscht und zu vermeiden. Aus diesem Grund soll an dieser Stelle nur auf hydrolytisch wirkende Modelle bzw. Komplexe eingegangen werden.

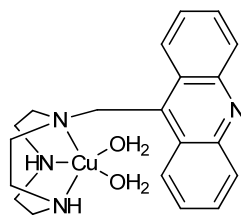
Bei den Metalloenzym-Mimetika sind ein- und zweikernige Komplexe bekannt<sup>[23]</sup>, die überwiegend Elemente des d- oder f-Blocks (hier Lanthanide) enthalten. Dabei wurden vor allem drei- und vierwertige Metalle wie Tm, Yb, Lu, Pr, Eu, Er und Ce eingesetzt, die –in geeignete Liganden eingebettet– bemerkenswerte Hydrolyseaktivitäten gezeigt haben. Da Lanthanid-Komplexe aber schlecht löslich und toxisch sind, bei physiologischem pH Hydroxid-Gele formen und einem leichten Ligandenaustausch unterliegen was die Einsetzbarkeit stark einschränkt<sup>[24]</sup>, hat man auch Elemente wie Zn<sup>[25]</sup>, Cu, Co und Fe untersucht.

Mit Fe<sub>2</sub>(DTPB)(μ-O)(μ-Ac)Cl(BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub> hat man einen Komplex gefunden, der Plasmid-DNA mit einer Halbwertszeit (HWZ) von 5 min von Form I in Form II umwandeln kann (Geschwindigkeitskonstante: 2.1\*10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> bei 37 °C und pH 7)<sup>[26]</sup>.

**10**

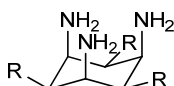
**Abbildung 3-5:** Struktur des Benzimidazol-haltigen Liganden DTPB **10** (1,1,4,7,7-penta-(2'-benzimidazol-2-ylmethyl)-triazazaheptane).

Auf der Basis von Cu hat man einen Alkylamin-Komplex mit Acridin (einem DNA-Interkalator) konjugiert, und konnte so die Affinität zur DNA weiter erhöhen. Dieser Komplex **11** ist reaktiv genug, um Plasmid-DNA bei pH 7 und 37 °C unter aeroben und anaeroben Bedingungen zu hydrolysieren<sup>[27]</sup>.

**11**

**Abbildung 3-6:** Struktur des Cu-Komplexes mit 1,4,7-Triazacyclononan als Ligand und angebrachtem Acridin als DNA-Affinitäts-Einheit.

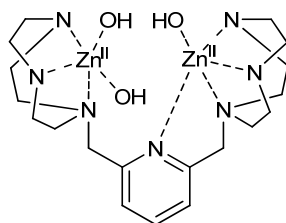
Ein anderer Cu-Komplex mit dem substituierten Triaminocyclohexan (R = OH) **12** als Ligand spaltet Plasmid-DNA bei 35 °C und pH 8.1. Die Reaktion konnte weder durch Hydroxylradikalfänger noch durch anaerobe Reaktionsbedingungen unterdrückt werden<sup>[28]</sup>.

**12**

**Abbildung 3-7:** Der dreizählige Ligand cis,cis-Triaminocyclohexan zur Komplexbildung von Cu.

Trotz dieser Ergebnisse konnte eine nicht-hydrolytische Spaltung nicht vollends ausgeschlossen werden, da Re-Ligationsexperimente mit den Spaltfragmenten nicht erfolgreich waren.

Lu *et al.* stellten 2008 den dinuklearen Zink-Komplex **13** mit einem Azakronenether-tragenden Pyridin-Derivat als Liganden vor<sup>[29]</sup>. Dieser Komplex spaltet in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  pUC19 Plasmid-DNA zu 80 % bei 37 °C, pH 6.8 und 15 h Inkubation.



**13**

**Abbildung 3-8:** Der dinukleare Zink-Komplex **13** spaltet Plasmid-DNA bei pH 6.8 zu 80 % nach 15 h Inkubation.

Der Ligand allein zeigt eine Inaktivität gegenüber Plasmid-DNA, und auch in Anwesenheit von anderen Metallen (von Zink abgesehen) ist der resultierende Komplex kaum aktiv.

Ein etwas naheliegenderer Ansatz besteht in der Verwendung von Zink-Finger-Mutanten, die BNPP und DNA hydrolysieren können<sup>[30]</sup>. Bei dieser Mutante sind die 2 Cystein-Aminosäuren, die normalerweise an das Zn binden, gegen Histidin ersetzt worden<sup>[31]</sup>, wobei die Sequenz generell auf der des Transkriptionsfaktors Sp1 basiert. Durch die Anlehnung an Sp1 kommt auch die hohe Affinität und Selektivität für die GC-Box<sup>[32]</sup>. Die Affinität konnte noch weiter gesteigert werden, indem drei solcher Zink-Finger direkt hintereinander synthetisiert wurden<sup>[33]</sup>. Unter Verwendung der DNA-spaltenden Domäne von *FokI* ist mit Zink-Fingern ein Konjugat hergestellt worden, mit dem selektiv DNA gespalten werden konnte<sup>[34]</sup>.

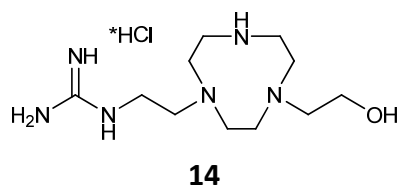
Eine Alternative ist die Verwendung von PNA-Molekülen, an die eine Metall-chelatisierende Einheit synthetisiert wird. Diesen Ansatz haben Krämer *et al.* verfolgt, und mit Verwendung von Zr(IV) selektiv Einzelstrang-DNA hydrolysieren können<sup>[35]</sup>. Da aber wegen der niedrigen Metall-Affinität des Chelators ein Überschuss von Zr(IV) eingesetzt werden musste, trat auch eine nicht unerhebliche Menge von unspezifischen, nicht-selektiven Spaltstellen auf. Trotzdem wiesen die Spaltstellen eine erstaunliche Regioselektivität auf, denn man erhielt überwiegend Spaltung der P-O3'-Bindung.

### 3.4.2 Metallfreie Modelle

Während die Literatur für metallhaltige Modelle sehr viele Beispiele und Publikationen aufweist, ist für metallfreie Modelle genau das Gegenteil zutreffend. Es ist ohne Verwendung von metallischen Lewis-Säuren wesentlich schwieriger (aber nicht unmöglich), Moleküle mit DNA-spaltenden Eigenschaften darzustellen.

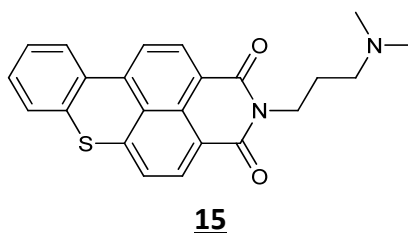
Interessant ist daher das von Lu *et al.* vorgestellte Molekül **14**<sup>[36]</sup>, welches, wie manche der bereits in der Arbeitsgruppe Göbel bekannten Moleküle, ein Guanidin und eine (hier alipha-

tische) Alkohol-Funktion trägt. Die Autoren berichten u.a. von Experimenten bezüglich des optimalen pH-Wertes und des zeitlichen Verlaufs der Spaltung.



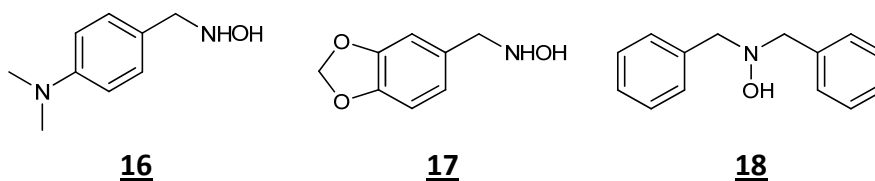
**Abbildung 3-9:** Der Monoguanidinium-alkohol **14** besteht zusätzlich zum O-Nucleophil und der Guanidinium-Einheit noch aus dem Aza-Kronenether TACN. Das Molekül (0.144 mM) spaltet Plasmid-DNA optimal bei pH 7.2 und erreicht nach etwa 22 h Inkubation bei 37 °C eine vollständige Umwandlung in die nicked-Form.

Einen etwas anderen Ansatz verfolgten Qian *et al.* mit der Verbindung **15**<sup>[37]</sup>. Dieses Molekül besteht aus einem aromatischen, schwefelhaltigen Interkalator und einen tertiären Alkylamin. Dieses Molekül zeigte DNA-spaltende Eigenschaften bei pH 7.5 und 5 stündiger Inkubation bei 70 °C.



**Abbildung 3-10:** Das Molekül **15** spaltet nach dem von den Autoren vorgeschlagenen Mechanismus DNA durch Aktivierung eines Wasser-Moleküls.

Auf der Basis von diversen Hydroxylamin-Derivaten haben Terenzi *et al.* verschiedene Moleküle auf DNA-spaltende Eigenschaften untersucht<sup>[38]</sup>. Die Moleküle **16** bis **18** zeigen allesamt Plasmid-Spaltung bei Konzentrationen von etwa 80 µM in 25 mM HEPES-Puffer, pH 8 und 50 °C.



**Abbildung 3-11:** Die Verbindungen **16**, **17** und **18** basieren auf benzyllischen Hydroxylamin-Derivaten und spalten allesamt -in unterschiedlichem Maße- Plasmid-DNA in der *major groove*.

Dieser DNA-spaltende Effekt wird durch Radikal-Scavenger nur teilweise unterbunden, was dafür spricht, dass hier wohl mehrere Mechanismen der Spaltung parallel ablaufen. Untersuchungen mit gleichzeitiger Zugabe von Distamycin zeigten eine Präferenz der *major groove* als Ort der Spaltung für die genannten Verbindungen.

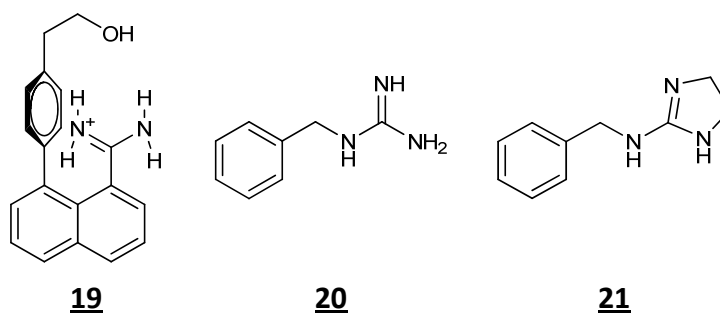
### 3.4.3 Übersicht über die Vorgängerarbeiten

Die Entwicklung einer künstlichen Nuklease gleicht einer Evolution: man beginnt mit einem Molekül, testet es auf Aktivität (entweder mit Modell-Phosphaten oder mit supercoiled Plasmid-DNA) und verändert dann anhand der gewonnenen Ergebnisse entsprechend die Struktur. Diesen Zyklus durchläuft man, bis man letztlich ein Molekül findet, welches anhand seiner Eigenschaften auch künstliche Nuklease genannt werden darf.

Die ersten Verbindungen auf diesem Gebiet konnten lediglich aktivierte Phosphoester spalten, und waren noch weit entfernt von der notwendigen Aktivität, um DNA-Phosphoester zu substituieren.

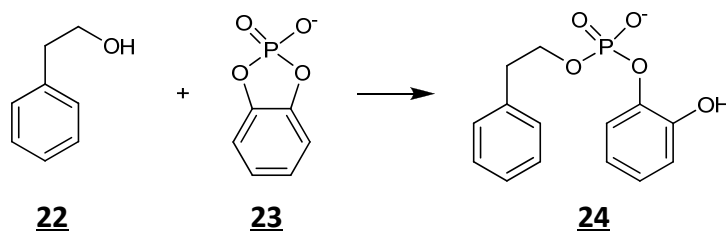
Zunächst benötigte man einen strukturellen Startpunkt. Zur synthetischen Darstellung einer metallfreien künstlichen Nuklease bietet es sich an, bekannte Enzyme zu betrachten und geeignete Strukturmodule daraus abzuleiten. So birgt das aktive Zentrum der Staphylokokkennuklease durch die beiden Arginin-Reste (Arg), die die Phosphat-Gruppe klammern, einen geeigneten Startpunkt. Diese beiden Arg-Reste lassen sich durch synthetisch leicht zugängliches Guanidin imitieren, womit schon das kationische, Wasserstoffbrücken-Donor-Strukturmotiv gefunden wäre. Als Nucleophil soll ein Alkohol dienen, dessen genaue Kettenlänge zunächst noch unbekannt ist. Diese beiden funktionellen Einheiten sollen kovalent an einem Aromaten angebracht sein.

Der strukturellen Ableitung eines Katalysators aus dem aktiven Zentrum der Staphylokokkennuklease gingen andere Arbeiten auf dem Gebiet der Phosphodiester-Spaltung voran, die hier nicht unerwähnt bleiben sollen. Dabei entstanden u.a. die Monokationen **19**, **20** und **21**, die in einem Testsystem (siehe *Abbildung 3-13* und *Abbildung 3-14*) auf ihre Reaktivität bzw. Spaltaktivität getestet wurden<sup>[39,40]</sup>.



**Abbildung 3-12:** Einige der ersten eingesetzten Monokationen für die Phosphodiester-Spaltung.

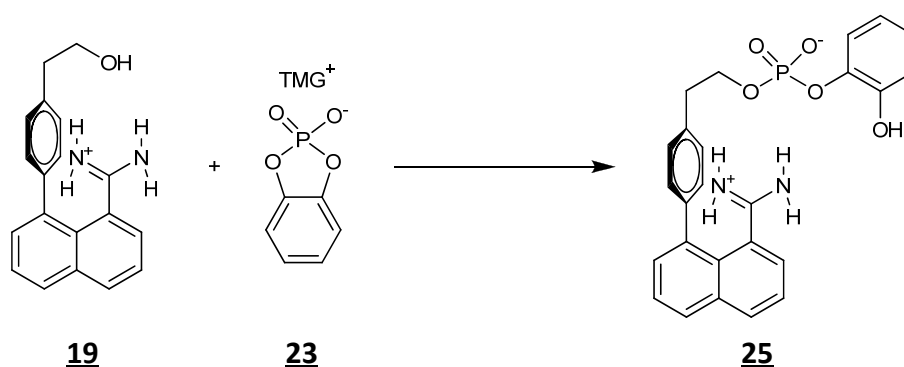
Die Testreaktion dient dazu, die Geschwindigkeit der Esterspaltung zu bestimmen. Sie wird nach folgendem Schema durchgeführt (siehe *Abbildung 3-13*):



**Abbildung 3-13:** Schematisch dargestellte Kontroll-Reaktion des Testsystems zur Bestimmung der Geschwindigkeit von Phosphodiester-Spaltungen. Gegenionen wurden zwecks besserer Übersicht weggelassen.

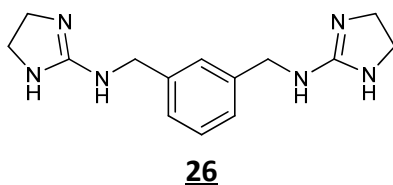
Man verwendet zunächst den sehr reaktiven Phosphodiester **23**<sup>[41,42]</sup>, der mit dem ungeladenen Alkohol **22** in dipolar-aprotischen Solventien zu **24** „umgeestert“ werden sollte. Die Reaktion mit **22** stellt dabei die Kontrollreaktion dar, die als Basis für die Bestimmung der Beschleunigung herangezogen wird.

Für das Screening wird der Alkohol **22** gegen jeweils einen der hergestellten Phosphatspalter ersetzt. In *Abbildung 3-14* ist zur Verdeutlichung exemplarisch **19** aufgeführt. So bildet **19** mit **23** zunächst einen Ionenpaarkomplex, in welchem das negativ geladene Phosphat über Wasserstoffbrücken an das positiv geladene Amidin koordiniert ist. Die freie OH-Gruppe von **19** reagiert dann quasi-intramolekular unter Ringöffnung mit dem cyclischen Phosphat **23**. Bei dieser Additions-Eliminierungsreaktion wird ein Ester gespalten und gegen einen anderen ersetzt, wobei **25** gebildet wird. Man fand, dass **19** die Reaktion des Testsystems um das 25fache beschleunigte. Für **20** fand man die 75fache und für **21** sogar die 420fache Geschwindigkeit.



**Abbildung 3-14:** Typische Testreaktion zur Evaluation der Aktivität eines potentiellen Phosphodiester-Spalters (hier von **19**). Gegenionen wurden zwecks besserer Übersicht in der Darstellung teils weggelassen.

Als Katalysatoren sind neben Mono- auch Bis- und Tris(guanidinium)-Verbindungen eingesetzt worden, wobei das Bisguanidin **26** – ein von der Staphylokokkennuklease abgeleitetes Molekül – die bis dato höchste Beschleunigung (4800fach) der Testreaktion lieferte<sup>[43]</sup>.

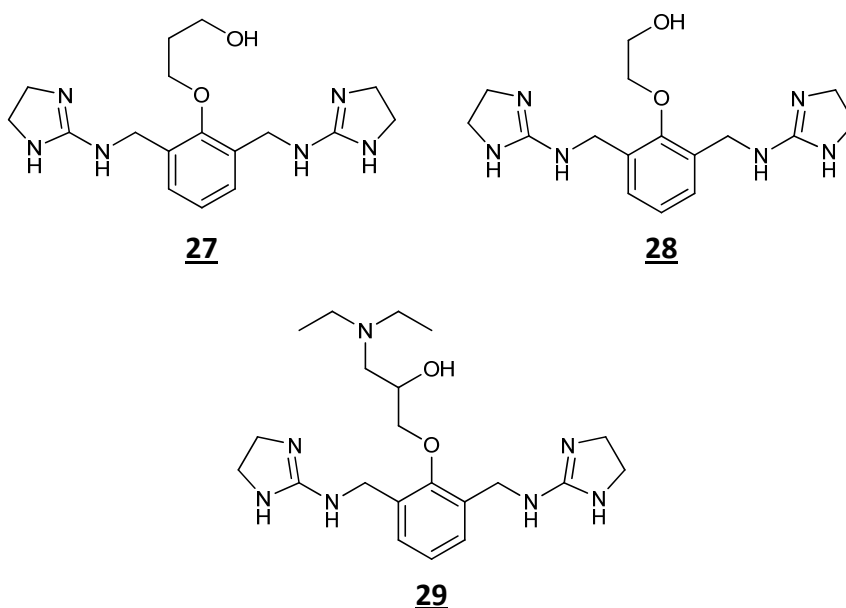


**Abbildung 3-15:** Zentrales Molekül als Ausgangspunkt zur Entwicklung einer künstlichen Nuklease.

Bemerkenswert ist bei dieser Struktur, dass sie die Testreaktion stärker beschleunigt als **19** das vermag, obwohl sie kein intramolekulares alkoholisches Nucleophil enthält. Das Bis-guanidin **26** stellt den Ursprung für die weiteren Entwicklungen auf diesem Gebiet dar.

### 3.4.3.1 Verbindungen der ersten Generation

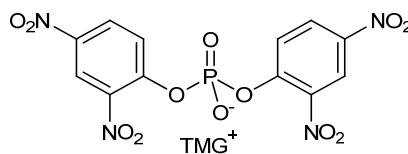
Als nächster Schritt bot sich an, das Bisguanidin **26** mit einem aliphatischen Alkohol variabler Kettenlänge zu verbinden, um ein intramolekulares Nukleophil in das Molekül zu integrieren. Diese Arbeiten wurden von M.-S. Muche durchgeführt<sup>[44]</sup>, der die Bis(guanidinium)alkohole **27**, **28** und **29** darstellte, die gegenüber **26** eine zunehmende Reaktivität aufwiesen und dabei auch noch O-Phosphate lieferten.



**Abbildung 3-16:** Bis(guanidinium)alkohole der ersten Generation.

Die Moleküle der ersten Generation wurden dann mit dem weniger reaktiven Modellphosphat **30** auf ihre Aktivität getestet, wobei sich aber herausstellte, dass keine der drei Verbindungen ausschließlich das O-Phosphat als Produkt bildete.



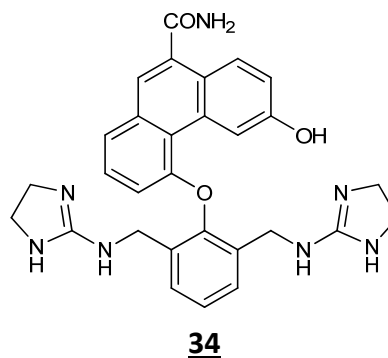
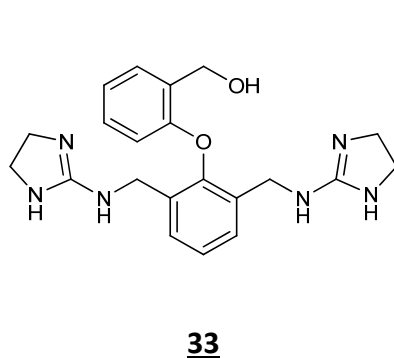
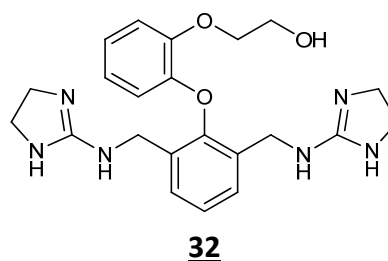
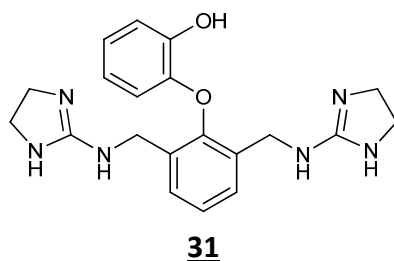


**Abbildung 3-17:** Strukturformel des Bis(2,4-Dinitrophenyl)phosphates (2,4-BDNPP), welches als weniger reaktives Modells substrat in den Modellreaktionen eingesetzt wurde.

Entweder gab es Produktgemische aus N- und O-Phosphat, oder aber es entstand nur das N-Phosphat, wie es bei Molekül **29** der Fall war. Trotzdem zeigte sich, dass man mit den gewählten Molekülen auf dem richtigen Weg war.

### 3.4.3.2 Verbindungen der zweiten Generation

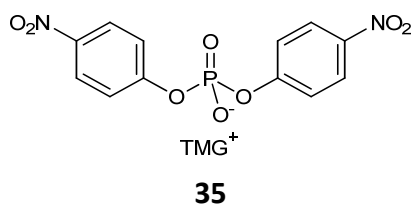
Bei den Verbindungen der zweiten Generation wurde von A. Büsing die aliphatische Kette zwischen dem Ether und dem Alkohol gegen einen aromatischen Bisalkohol ausgetauscht, um einmal die Nucleophilie zu erhöhen, aber auch um das System weniger flexibel zu machen<sup>[45]</sup>, da eine erhöhte Flexibilität auch eine Reduktion der Stoßwahrscheinlichkeit bedeutet (entropischer Effekt). Aus dieser Arbeit gingen u.a. diese Bis(guanidinium)alkohole hervor:



**Abbildung 3-18:** Einige Verbindungen der zweiten Generation von künstlichen Nukleasen.

Dadurch nahm die Reaktivität von **31** nach **34** zu, und wiesen damit allesamt eine höhere Reaktivität (in der Modellreaktion mit **30**) auf als die Verbindungen der ersten Generation. Leider entstanden bei diesen Molekülen auch wieder sowohl N- als auch O-Phosphate als Spaltprodukte.

Da aber das Modellphosphat **30** von der Reaktivität her den Phosphodiestern der DNA noch nicht ähnlich genug war, hat man als weiteres das Modellsubstrat **35** getestet, welches wiederum weniger reaktiv ist.

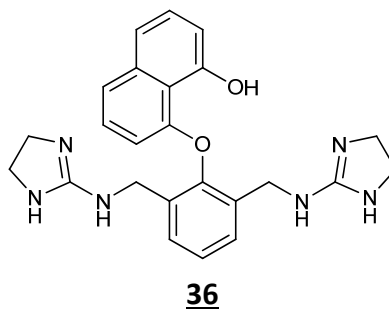


**Abbildung 3-19:** Das Modellphosphat Bis(4-Nitrophenyl)phosphat (4-BNPP) zur weiteren Annäherung an die geringe Reaktivität von DNA-Phosphodiestern.

Wie erwartet waren die Reaktionen mit **35** langsamer als mit **30**, und auch in diesem Fall erhielt man sowohl N- als auch O-Phosphate. Es stellte sich heraus, dass die phenolischen Bis(guanidinium)alkohole wesentlich schneller reagierten als die aliphatischen Alkohole. Das reaktivste Molekül war zu diesem Zeitpunkt das Phenanthren **34**, mit dem erstmals Plasmid-DNA gespalten werden konnte. Man bewegte sich hier in einem Konzentrationsbereich von 10 (~ 11 % Spaltung) bis 5000  $\mu\text{M}$  (~ 18 % Spaltung). Da die Kettenlänge von **34** immer noch nicht optimal schien (angestrebt waren ausschließlich O-Phosphate als Produkte in Testreaktionen), wurde aufgrund der Ergebnisse von **33** basierend auf dessen Strukturmodell eine weitere Generation von Bis(guanidinium)alkoholen entwickelt.

### 3.4.3.3 Verbindungen der dritten Generation

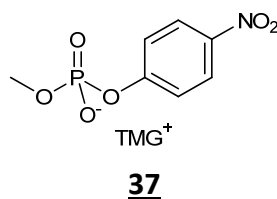
Auf der Grundlage der vorangegangenen Ergebnisse wurde Verbindung **36** von Z. Nazir hergestellt<sup>[46]</sup>, welche eindrucksvoll bewies, dass die Vermutung über die noch nicht optimale Kettenlänge richtig war.



**Abbildung 3-20:** Naphthol-haltiger Bis(guanidinium)alkohol mit optimaler Kettenlänge (C<sub>3</sub>-Kette). Dies ist die erste Verbindung, die ausschließlich O-Phosphate in den Modellreaktionen bildet.

Sowohl mit dem Modellphosphat **30** als auch mit dem weniger reaktiven Phosphoester **35** erhielt man in den Testreaktionen (vgl. Kapitel 10.6) ausschließlich die gewünschten O-Phosphate, wobei **36** auch noch schneller reagierte als das bis dato schnellste Phenanthren **34**.

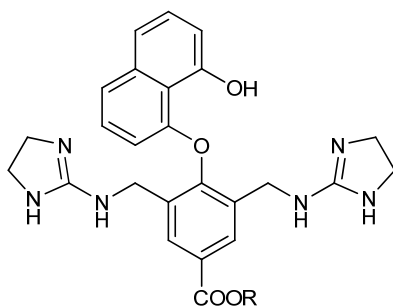
Als unreaktivstes Modellsystem verwendete man **37**, welches aber ebenfalls zum O-Phosphat gespalten werden konnte, wenn auch deutlich langsamer als **35**.



**Abbildung 3-21:** Das Methyl-4-Nitrophenylphosphat (MNPP) ist das unreaktivste in den Testreaktionen verwendete Modellphosphat.

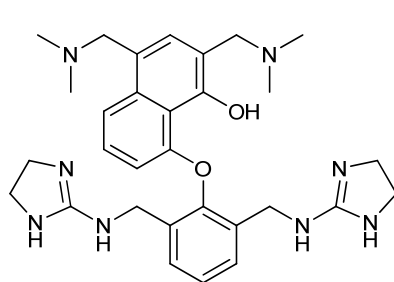
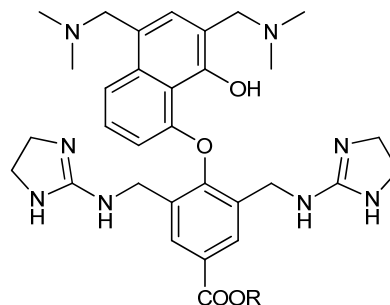
Der Bis(guanidinium)-Alkohol **36** wurde auch in Spalt-Experimenten mit pUC19-Plasmid-DNA eingesetzt, und erwies sich in einem Konzentrationsbereich von 1000 (~ 11 % Spaltung) bis 5000  $\mu$ M (~ 18 % Spaltung) als reaktiv.

In der weiterführenden Arbeit wurde versucht, die Affinität zu DNA noch weiter zu steigern, indem das Naphthol **36** so verändert wurde, dass es mit Gruppen wie Acridin oder Biotin konjugiert werden konnte<sup>[47]</sup>.

**38**

**Abbildung 3-22:** Exemplarisch dargestelltes Derivat des Bis(guanidinium)alkohols: für R wurde unter anderem Acridin oder auch Biotin verwendet.

Die Erhöhung der Affinität zur DNA war aber nur ein Ansatzpunkt, um den DNA-Spalter zu verbessern. Eine weitere Möglichkeit bestand in der Derivatisierung des Naphthols, indem zwei Mannich-Basen eingeführt wurden:

**39****40**

**Abbildung 3-23:** Die Bis(mannich)-Derivate von **36** bzw. **38**: diese sehr reaktiven Moleküle können potentiell über Chinonmethide Purine alkylieren.

Die Verbindung **39** war zwischen 20  $\mu\text{M}$  ( $\sim 12\%$  Spaltung) und 1000  $\mu\text{M}$  ( $\sim 48\%$  Spaltung) aktiv gegenüber Plasmid-DNA.

Die Bis(mannich)alkohole **39** und **40** stellten die zu der Zeit reaktivsten Verbindungen dar, mit denen - neben anderen - eine ganze Reihe weiterführender Experimente gemacht wurden. Hierbei konnten auch Erkenntnisse über einen möglichen Spaltmechanismus gewonnen werden. So ist deutlich geworden, dass **36** auch unter Abwesenheit von Sauerstoff Plasmide spalten kann, was einen oxidativen Mechanismus ausschließt<sup>[47]</sup>.

Die Bis(Mannich)-Verbindung **39** und deren Derivate sind durch ihre strukturellen Unterschiede zu **36** prinzipiell in der Lage - zusätzlich zu einem nucleophilen Angriff - durch Chinonmethide Purine zu alkylieren und so Spaltung zu induzieren. Die bei mechanistischen Studien mit diesen Verbindungen erhaltenen Daten sind jedoch nicht einheitlich, und man ist im Moment der Auffassung, dass sich evtl. mehrere Reaktionswege bei der DNA-Spaltung überlagern.

### 3.4.4 Ansätze zur weiteren Verbesserung von künstlichen Nukleasen

Das Bis(guanidinium)naphthol **36** bzw. dessen Derivate waren die zu dieser Zeit aktivsten, nicht oxidativ DNA-spaltenden Moleküle, welche aus jahrelanger Forschungsarbeit in der Arbeitsgruppe Göbel hervorgegangen sind. Bis jetzt hatte man viel Arbeit in die Aktivität der Verbindungen investiert, bis man letztlich auch Plasmid-DNA spalten konnte.

Die bisher dargestellten Verbindungen unterscheiden sich aber noch in einem wesentlichen Merkmal von z.B. Restriktionsendonukleasen: sie sind nicht sequenzselektiv.

Es sollte möglich sein, durch gängige, literaturbekannte Methoden (siehe dazu Kapitel 4) beispielsweise das Naphthol **36** bzw. **38** so zu derivatisieren, dass es selektiv an eine (beliebige, frei definierbare) DNA-Sequenz bindet (einen auf dieser Überlegung basierenden DNA-Spalter haben Giovannangeli *et al.* während der Endphase der vorliegenden Arbeit publiziert<sup>[48]</sup>).

Für eine erste Weiterentwicklung soll **36** so modifiziert werden, dass es an eine 5 Nukleotide lange DNA-Sequenz binden kann<sup>[iii]</sup>. Dies stellt einen angemessenen und sinnvollen Kompromiss zwischen Länge der Erkennungssequenz und synthetischem Aufwand dar (siehe hierzu auch Kapitel 5).

Die Hintergründe zur sequenzselektiven Erkennung und die Flexibilität dieser Methode werden im Detail in Kapitel 4 erläutert.

---

<sup>iii</sup> Für eine künstliche Nuklease ist eine Erkennungssequenz von 5 Basenpaaren zu wenig, da dies statistisch zu sehr vielen Spaltstellen (~ 3 Mio.) führen würde, läge man die menschliche DNA mit ihren ~ 3 Mrd. Basenpaaren zu Grunde. Eine Verlängerung auf 15 Basenpaare würde zu nur 2 bis 3 Spaltstellen bei menschlicher DNA führen, und damit sehr viel spezifischer als Restriktionsenzyme sein, die üblicherweise 4, 6 oder 8 Basenpaare erkennen.



## 4. MOLEKULARE ERKENNUNG IN DER KLEINEN FURCHE

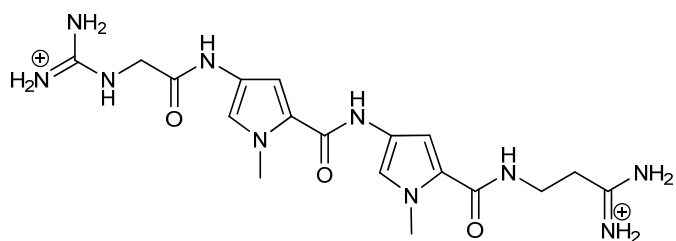
Für kleine Moleküle sind verschiedene Möglichkeiten der DNA-Erkennung bekannt<sup>[49]</sup>:

- Interkalation zwischen Nukleobasen-Paaren
- Bildung von Tripel-Helices in der großen Furche
- sogenannte Zinkfinger-Proteine, die ebenso in der großen Furche binden
- Bildung von Komplexen in der kleinen Furche mit kleinen Molekülen wie Netropsin und Distamycin (gilt nur für die B-Form der DNA)

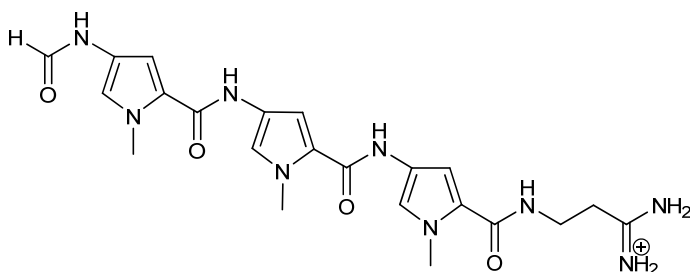
Hier soll nur das letzte Gebiet näher beleuchtet werden, auf dem vor allem in der Arbeitsgruppe von Peter B. Dervan intensiv geforscht wird.

### 4.1 Hintergründe und Evolution

Schon vor längerer Zeit hat man bei Naturstoffen wie Netropsin **41** und Distamycin **42** eine besondere Präferenz für A,T-reiche DNA-Sequenzen festgestellt. Besonders interessant sind die beiden Moleküle, und vor allem Distamycin, weil sie u. a. durch Transkriptions-Inhibierung vielfältige Wirkungen entfalten: sie wirken gegen Bakterien, Malaria, Pilze und Viren, wobei sie leider durch ihre hohe Toxizität nur von beschränktem Nutzen sind.



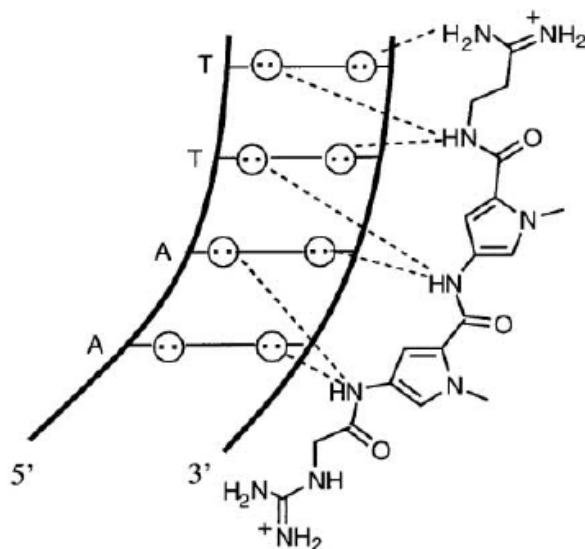
**41**



**42**

**Abbildung 4-1:** Die Naturstoffe Netropsin **41** und Distamycin **42** sind die Basis der Arbeiten von P. B. Dervan zur Darstellung sequenzselektiver Polyamide.

Das erste Molekül, welches detailliert charakterisiert wurde, war das Netropsin. NMR-Experimente zeigten direkte Wechselwirkungen zwischen Protonen auf der konkaven Molekülseite mit den Adenosin-Bausteinen der DNA<sup>[50,51]</sup>.



**Abbildung 4-2:** Schematische Darstellung des Komplexes von Netropsin mit der DNA-Sequenz AATT. Die Kreise mit den Punkten repräsentieren freie Elektronenpaare am N3 der Purine und am O2 der Pyrimidine (entnommen aus [51]).

Diese Erkenntnis wurde durch eine Kristallstruktur von Netropsin mit einem Tetramer der Sequenz AATT bestätigt<sup>[52]</sup>.

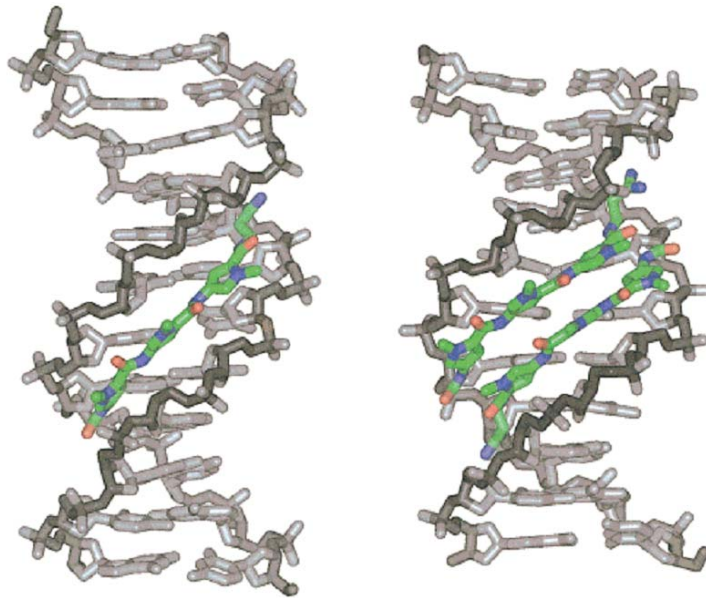
Das Distamycin stellt eine homologe Verbindung zu Netropsin dar. Der Unterschied liegt in der Anwesenheit eines dritten Pyrrol-Ringes und der Abwesenheit einer zweiten Amidin-Funktionalität. Die Bindungsaffinität ist jedoch annähernd dieselbe. Auch für das Distamycin hat man eine Röntgenstruktur aufklären können<sup>[53]</sup>.

Man hat Untersuchungen an Distamycin durchgeführt, welche zu einem Komplex von Distamycin mit einem DNA-Duplex führten, der die Tetramer-Sequenz AATT enthält<sup>[54,55]</sup>.

Man variierte dann die DNA-Sequenz und erhielt ein erstaunliches Ergebnis: Mit dem Pentamer AAATT bildete Distamycin einen 2:1-Komplex. Dies wurde dann von D. E. Wemmer durch NOE-NMR-Experimente weiter untersucht. Man kam zu der Erkenntnis, dass sich bei kleinen Konzentrationen 1:1-Komplexe bilden, sich aber bei höheren Konzentrationen 2:1-Komplexe bilden, bei denen zwei Distamycin-Moleküle antiparallel nebeneinander in der kleinen Furche gebunden sind<sup>[56]</sup>, was zu einer Aufweitung der kleinen Furche um 3,5 bis 4 Å führt<sup>[57]</sup>.

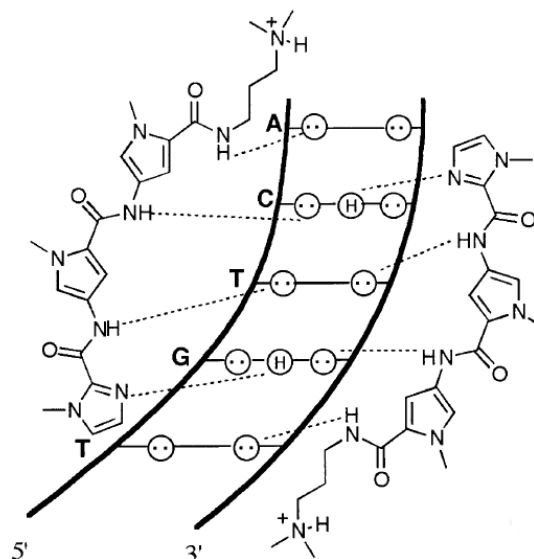
Bei Studien an der Sequenz ATATA fand man heraus, dass sich 2:1-Komplexe schon bei kleinen Konzentrationen von Distamycin bilden. Man schätzte, dass die Bindungskonstante des zweiten Distamycins etwa 100fach höher liegen musste als die des ersten. Die Sequenz AAAAA bildete erst 2:1-Komplexe, nachdem jede Helix einfach mit Distamycin komplexiert war<sup>[58]</sup>.





**Abbildung 4-3:** 1:1-Komplex von Distamycin A und DNA (links) und zum Vergleich der 2:1-Komplex (rechts). Man erkennt rechts deutlich eine Aufweitung der kleinen Furche (entnommen aus [57]).

Mit Netropsin beobachtete man keine 2:1-Komplexe, was durch die beiden positiv geladenen Enden des Moleküls erklärt wird: befänden sich 2 Netropsin-Moleküle in der kleinen Furche, wären die positiven Ladungen sowohl bei paralleler als auch bei anti-paralleler Orientierung benachbart, was zu elektrostatischer Abstoßung führt.



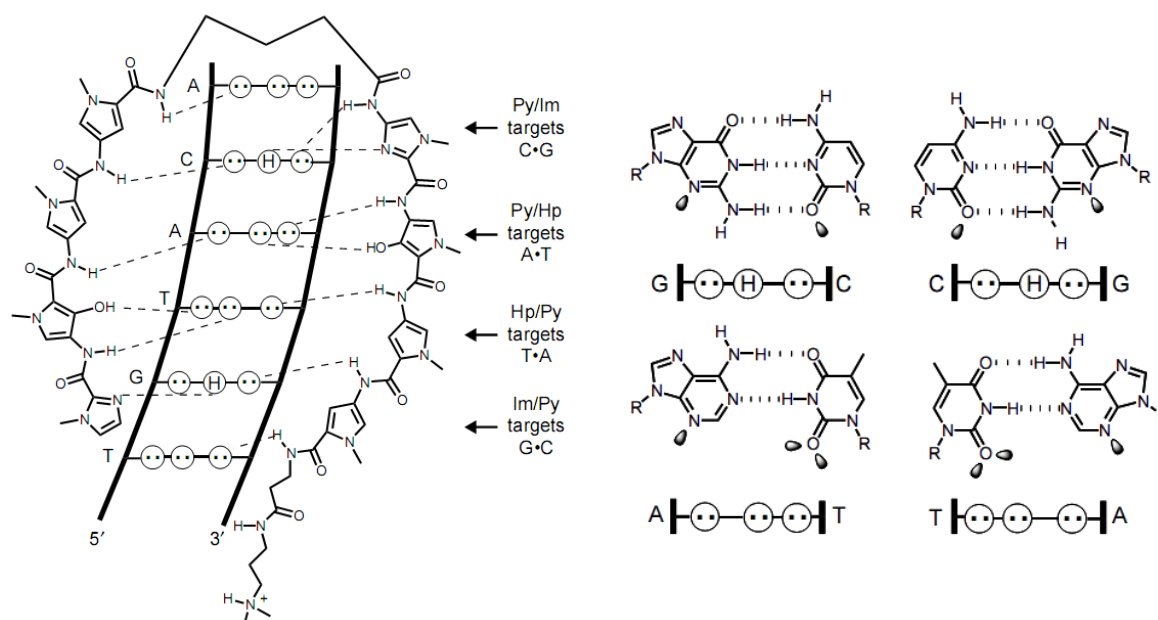
**Abbildung 4-4:** Distamycin-Derivat mit Imidazol-Einheiten gebunden an das Pentamer TGTC A.

Mit diesen Erkenntnissen kam natürlich die Frage auf, wie man die Sequenzerkennung auf die anderen Nukleobasen ausweiten könnte. Die Gruppen von Dickerson<sup>[59]</sup> und Lown<sup>[60]</sup> schlugen vor, Pyrrol-Einheiten (Py) durch Imidazol-Einheiten (Im) zu ersetzen, um auch an C-G-Paare binden zu können<sup>[61]</sup>.

Die Gruppe von P. B. Dervan führte Affinitätsspaltungs- und Footprinting-Experimente mit Distamycin-Derivaten durch<sup>[51]</sup> um so die Affinitäten der Verbindungen zu bestimmen. Weitere Studien führten zu dem Ergebnis, dass man mit dem Py/Im-Paar C-G, mit dem Im/Py-Paar G-C erkennen kann.

Um nun eine DNA wirklich sequenzspezifisch auslesen zu können, musste man noch A-T von T-A unterscheiden können. Wieder war es die Gruppe von Dervan, die Modifikationen an den Heterozyklen vornahm und letztendlich Hydroxypyrrrol einsetzte, um in Kombination mit Pyrrol A-T von T-A unterscheiden zu können<sup>[62,63]</sup>.

Mit diesen Heterozyklen hat man nun ein Repertoire, mit dem man Polyamide so herstellen kann, dass sie an vorgegebene DNA-Sequenzen binden. Die Affinität und Spezifität ist hierbei mit DNA-bindenden Proteinen vergleichbar<sup>[64]</sup>.



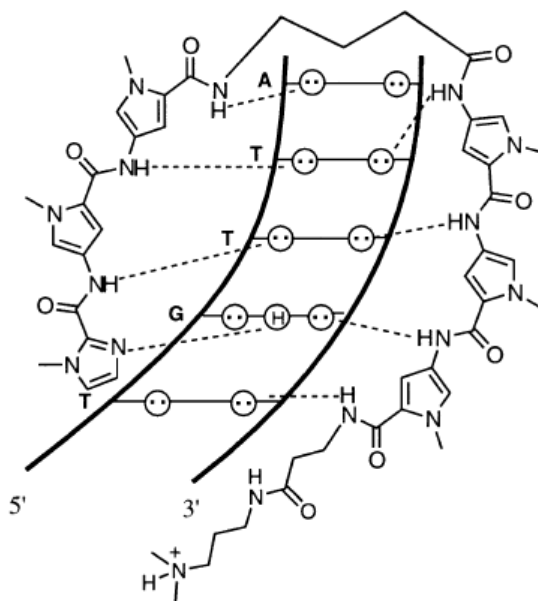
**Abbildung 4-5:** Links ein Polyamid, welches jede der 4 möglichen Basenpaare erkennen kann (Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen sind gestrichelt eingezeichnet); rechts sind freie Elektronenpaare und Wasserstoffbrücken-Donoren der einzelnen Nukleobasen gezeigt (entnommen aus [63]).

Zusammengefasst hat man die folgenden Korrelationen herausgefunden:

**Tabelle 4-1:** Übersicht über die jeweiligen Heterozyklen-Paare und deren Bindungspräferenz (+ = begünstigt, - = ungünstig)

	G-C	C-G	T-A	A-T
<b>Im/Py</b>	+	-	-	-
<b>Py/Im</b>	-	+	-	-
<b>Hp/Py</b>	-	-	+	-
<b>Py/Hp</b>	-	-	-	+

Aus der Erkenntnis, dass distamycinartige Amide 2:1-Komplexe mit DNA-Duplexen bilden, entstand die Idee, 2 Moleküle aneinander zu koppeln. Dervan's Gruppe hat diese Arbeiten erfolgreich durchgeführt<sup>[65,66]</sup> und verwendet nun GABA-Linker, um die Amid-Stränge zum Polyamid zu verbinden, weil der GABA-Linker für die Bildung einer Hairpin-Struktur in der *minor groove* die optimale Länge aufweist. Diese Modifikation hat zu einer weiteren Erhöhung der Affinität um ca. das 100fache geführt.



**Abbildung 4-6:** Im-Py-Py-γ-Py-Py-Py-β-Dp-Polyamid, welches an die Sequenz 5'-TGTTA-3' bindet.

Ein Nebeneffekt dieses GABA-Linkers ist die Selektivität für A/T-Basenpaare, die durch sterische Repulsion mit der exozyklischen Amino-Funktion von Guanin erklärt wird<sup>[67]</sup>.

Solche Hairpin-Polyamide haben genauso wie zwei einzelne antiparallel gebundene Verbindungen eine N→C-Orientierung in Bezug auf die 5'→3'-Richtung der DNA.

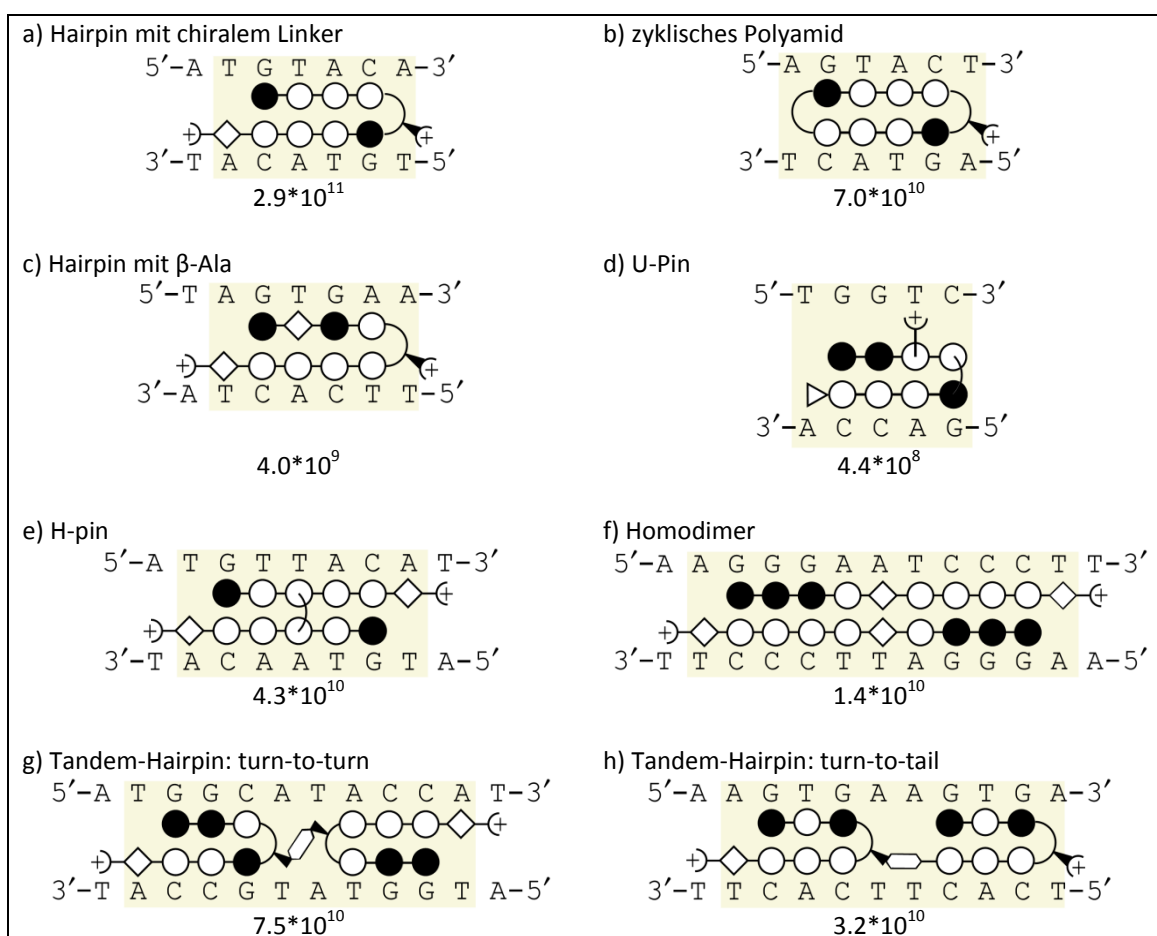
Diese Chemie wurde immer weiter entwickelt; so hat die Gruppe um P. Dervan etwa den GABA-Linker mit einer zweiten Amino-Funktion versehen, um noch andere Moleküle – wie etwa ein zweites Hairpin-Polyamid – daran zu koppeln. Daneben erhöht diese Amino-Gruppe die Affinität des Polyamids zur DNA und gleichzeitig verhindert sie durch sterische Wechselwirkung eine falsche Orientierung in der *minor groove*, die bei einigen Molekülen beobachtet wurde<sup>[68,69]</sup>.

Um diese Chemie auch für biologische Anwendungen attraktiv zu gestalten, muss die Bindungsstelle möglichst selten in der DNA vorkommen. Sie sollte daher nicht zu kurz sein. Das von Dervan verwendete Standard-Polyamid bindet mit den Beiträgen von GABA und β-Alanin aber nur an 6 Basenpaare. Die Erweiterung auf längere Bindungssequenzen ist zunächst durch Verlängerung der Polyamid-Kette erforscht worden. So sind viele Distamycin-Derivate hergestellt worden, die 4, 5 oder gar 6 Pyrrol-Einheiten enthielten. Man erkannte dabei, dass die Moleküle mit 4 oder 5 Pyrrol-Einheiten besser, die mit 6 Pyrrolen jedoch

schlechter an DNA binden. Die Ursache hierfür ist in der Krümmung des Polyamids zu suchen, welche ab 6 Pyrrol-Einheiten nicht mehr mit der Krümmung der DNA in der kleinen Furche übereinstimmt, was zu einer niedrigeren Affinität führt<sup>[70]</sup>.

Man hat dann einige Pyrrol-Einheiten durch das flexible  $\beta$ -Alanin ersetzt und so 16 Basenpaare adressieren können<sup>[71]</sup>. Ein anderer Ansatz ist die Verbindung von 2 Hairpin-Polyamiden, womit die Erkennung auf 10 Basenpaare ausgeweitet werden konnte<sup>[72,73,74]</sup>.

Diese und weitere Versuche<sup>[75]</sup> zur Steigerung der Affinität bzw. der Länge der Bindungssequenz sind in *Abbildung 4-7* in der von Dervan gebräuchlichen Kurzdarstellung aufgelistet.

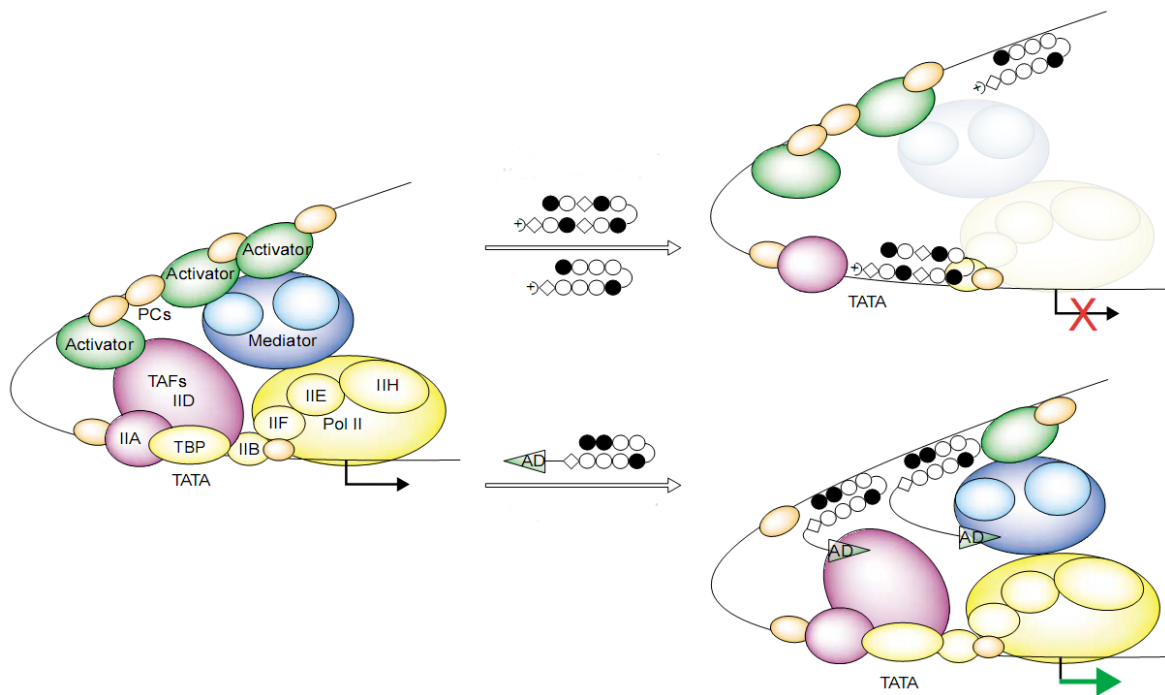


**Abbildung 4-7:** Die verschiedenen Polyamid-Strukturen im Überblick: die schwarzen Kreise stehen für Imidazol, weiße Kreise für Pyrrol, Rauten für  $\beta$ -Alanin, gebogene Linien bedeuten Linker (im Fall von d und e) über die Ring-Stickstoffe verbrückt. Die Zahlen unter den Abbildungen sind die  $K_a$  in  $M^{-1}$ . Abbildungen und Werte entnommen aus [63].

Über dieses systematische Vorgehen<sup>[76]</sup> unter Einbeziehung von strukturbasiertem Ligandendesign ist es Dervan gelungen, die bisher vielversprechendste Methode zu entwickeln, um doppelsträngige DNA sequenzspezifisch auszulesen.

## 4.2 Weiterführende Experimente

Das eigentliche Ziel von P. Dervan ist die Manipulation der Gen-Expression unter Zuhilfenahme der Polyamide. Dabei sind sowohl die Unterdrückung als auch die Verstärkung der Transkription von Interesse. Die Polyamide sind auch von anderen Arbeitsgruppen aufgegriffen und für die eigenen Zwecke geeignet derivatisiert worden.



**Abbildung 4-8:** Einflussnahme auf die Gen-Expression: speziell designte Polyamide können die Transkription sowohl verhindern als auch verstärken. Beim oberen Pfeil werden natürliche Aktivatoren und TFs durch Polyamide verdrängt bzw. blockiert. Beim unteren Pfeil werden natürliche Aktivatoren durch künstliche Polyamid-TFs ersetzt (entnommen aus [63]).

Die vielfältigen Einsatzgebiete sollen hier (in einer nicht vollständigen Übersicht) kurz dargestellt werden. Eine vollständigere Übersicht ist in einem Review von P. Dervan zu finden<sup>[77,78]</sup>.

### 4.2.1 Unterdrückung der Gen-Expression

DNA-bindende Proteine sind oft an der Regulation der Transkription beteiligt. Solche Proteine werden Transkriptionsfaktoren (TF) genannt und sind lohnende Ziele der Manipulation, weil es wesentlich weniger onkogene Transkriptionsfaktoren als onkogene Signaling-Proteine gibt.

- Ein Ansatzpunkt ist die Unterdrückung der Bindung des Zink-Finger-Proteins TFIIIA<sup>[79]</sup> an die DNA, womit die Expression der 5S-RNA des Ribosoms durch die RNA-Polymerase III sowohl *in vitro* als auch in *Xenopus* Nierenzellen<sup>[80]</sup> verhindert werden konnte. Die Inhibierung dieser TFs könnte sich als viel versprechender Angriffspunkt zur Behandlung von Krebs<sup>[81]</sup> erweisen, da so verhindert wird, die Translations-Maschinerie aufzubauen.
- Weitere Ziele sind virale Gene, die durch RNA-Polymerase II transkribiert werden. Hierbei hat man die Expression von HIV-1-TFs erfolgreich in einem zellfreien System unterdrücken können<sup>[82]</sup>. In humanen Blut-Lymphozyten konnte die Virus-Replikation um 99% vermindert werden, ohne dabei die Lebensfähigkeit der Zelle zu beeinträchtigen. Man sieht diese Inhibierung als einen indirekten Beweis für die spezifische Inhibierung der Transkription durch Polyamide.
- Das Protein NF- $\kappa$ B ist ein wichtiger Faktor z. B. bei der Entwicklung, bei Entzündungen und bei viraler Expression. Es liegt als Heterodimer vor und bindet an DNA in der Großen Furche. Polyamide in der Bindestelle von p53 (jedoch in der Kleinen Furche) konnten die Komplexbildung von DNA und p53 dennoch verhindern, so dass man hierbei einen allosterischen Mechanismus vermutet<sup>[83]</sup>.
- Der Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) spielt eine besondere Rolle bei der Angiogenese von Tumoren, denn der Anschluss an den Blutkreislauf ist für den Tumor notwendig, um über eine gewisse Größe hinaus zu wachsen. Dadurch wird aber auch die Metastasierung gefördert. Man hat Polyamide dazu verwendet, um die Bindung von HIF (*hypoxia-inducible factor*) an HRE (*hypoxia response element*) zu unterbinden, was dazu führte, dass wesentlich weniger VEGF in HeLa-Zellen exprimiert wurde<sup>[84]</sup>. Damit ist auch die Inhibierung der Angiogenese ein lohnenswerter Ansatzpunkt.
- Von basischen Leucin-Zipper-Proteinen (bZIP) ist bekannt, dass sie sich nicht von (gewöhnlichen) Hairpin-Polyamiden verdrängen lassen. Die Bindung von GCN4 (*general control nonderepressible*) konnte jedoch durch ein Polyamid-Acridin-Konjugat inhibiert werden, weil diese Moleküle die Mikrostruktur der DNA stören, indem sie die Drehung der Helix deformieren. Der Polyamid-Teil wird dabei an eine Sequenz neben das bZIP-Protein adressiert, und der Acridin-Teil interkaliert in die DNA und verhindert die Bindung des Proteins. Solche Konjugate sind vielversprechende Kandidaten zur selektiven Inhibierung von beliebigen DNA-bindenden Proteinen<sup>[85]</sup>.

- Die Gen-Expression lässt sich auch durch andere Ansätze unterdrücken. So ist es möglich, die zwei Windungen der DNA um den Histon-Komplex mit einem Tandem-Polyamid quer zu vernetzen. Ist das Polyamid erst mal in der „Supergroove“ gebunden, lässt sich die DNA nicht mehr vom Histon entfernen. Da der Großteil der DNA in einer Zelle an Nucleosomen gebunden ist, eignet sich dieser Ansatz ebenso zur Gen-Regulation<sup>[86,87]</sup>.

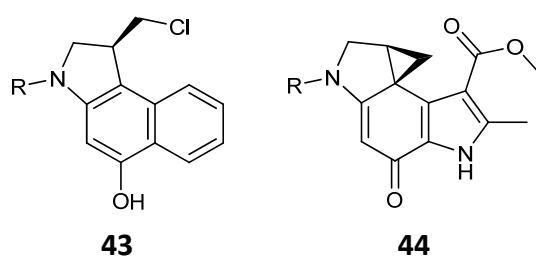
#### 4.2.2 Verstärkung der Gen-Expression

Der gegenteilige Effekt zur Unterdrückung, nämlich die Verstärkung der Gen-Expression, lässt sich generell durch zwei Ansätze realisieren: durch Verdrängung von Repressoren oder durch Rekrutierung von DNA-bindenden Proteinen.

- Zum ersten Punkt hat man Experimente mit dem Cytomegalovirus (CMV) durchgeführt, und konnte durch Verdrängung des Repressor-Proteins IE86 von MIEP (*major immediate early promotor*) die Expression des Virus verstärken<sup>[88]</sup>.
- Für den zweiten Punkt muss ein Polyamid die Eigenschaften von TFs imitieren: diese bestehen aus einer DNA-bindenden Domäne und eine Domäne zur Rekrutierung der Transkriptions-Maschinerie. Man kann Hairpin-Polyamide als Ersatz für eine DNA-bindende Domäne ansehen, und diese mit einer Aktivierungs-Domäne (z. B. einem geeigneten Peptid) verbinden. In Experimenten hat man gesehen, dass diese künstlichen Transkriptionsfaktoren (ATF) die Transkription verstärken können<sup>[89,90,91]</sup>. So beispielsweise bei der Homebox-TF-Familie (Hox), die u. a. von Bedeutung bei der Embryonal-Entwicklung ist. Das Protein selbst besitzt nur eine schwache Affinität zur DNA und wird vielmehr durch die Proteine der TALE-Klasse (*Three amino acid loop extension*, wie z. B. Exd) rekrutiert. Man hat ein Polyamid geeignet funktionalisiert und erfolgreich das Hox-Protein Ultrabithorax (Ubx) zur DNA führen können<sup>[92]</sup>. Dies war ein Beweis dafür, dass sich *in vitro* Komplexe aus DNA, Proteinen und funktionalisierten Polyamiden stabilisieren lassen.
- Ein Konjugat aus einem Polyamid und Camptothecin konnte spezifisch Topoisomerase I an die DNA rekrutieren und damit Einzelstrangbrüche induzieren<sup>[93]</sup>.

### 4.2.3 DNA-Alkylierung

Die sequenzselektive Alkylierung von DNA ist ebenso demonstriert worden. Dazu wurde in der Arbeitsgruppe von Sugiyama das Alkylans seco-CBI **43** an Polyamide konjugiert, und eine Alkylierung in direkter Nachbarschaft der Bindestelle an Adenin nachgewiesen<sup>[94,95]</sup>. Das Analog mit CPI **44** wurde in der sequenzselektiven Alkylierung von Adenin in Telomeren eingesetzt. Die Aktivität dieser Konjugate wurde in allen Krebszell-Linien nachgewiesen, wobei die Aktivität z. T. höher war als die von Cis-Platin oder Bleomycin<sup>[96]</sup>.



**Abbildung 4-9:** Die Alkylanzien seco-CBI **43** und CPI **44**; R steht hier für jeweils ein komplettes Polyamid.

### 4.2.4 Polyamid-Trafficking

Während der Einfluss von Polyamiden auf DNA-Protein-Komplexe in Lösung recht einfach zu beobachten ist, hängt es in Zellkulturen stark von Zelltyp ab, ob ein Effekt nachzuweisen ist. Um den Grund dafür zu erfahren, wurden Polyamide mit Fluoreszenz-Farbstoffen konjugiert, um die Verteilung in diversen Zell-Linien beobachten zu können<sup>[97,98]</sup>. In T-Lymphozyten wurde tatsächlich eine Aufnahme der Polyamide in den Zellkern beobachtet; aber in den anderen Zell-Linien fand man die Konjugate in Lysosomen oder anderen cytoplasmischen Vesikeln. Die Gruppe von Bashkin fand heraus, dass man den Transport von Polyamiden zum Zellkern mit dem P-Glycoprotein-Inhibitor Verapamil induzieren kann<sup>[99]</sup>.

Bisher gibt es noch keine allgemeinen Regeln um erfolgreiche zelluläre Aufnahme von Polyamiden vorhersagen zu können. Es scheint so, als hätte jeder Zell-Typ eigene Bedingungen, die zur Aufnahme von Polyamiden erfüllt sein müssen. Aber schon kleine Veränderungen im Molekül können einen großen Unterschied machen, ob es in eine Zelle aufgenommen wird oder nicht. So ändern sich die Eigenschaften der Zellgängigkeit allein durch An- oder Abwesenheit von beispielsweise  $\beta$ -Alanin drastisch<sup>[98]</sup>.



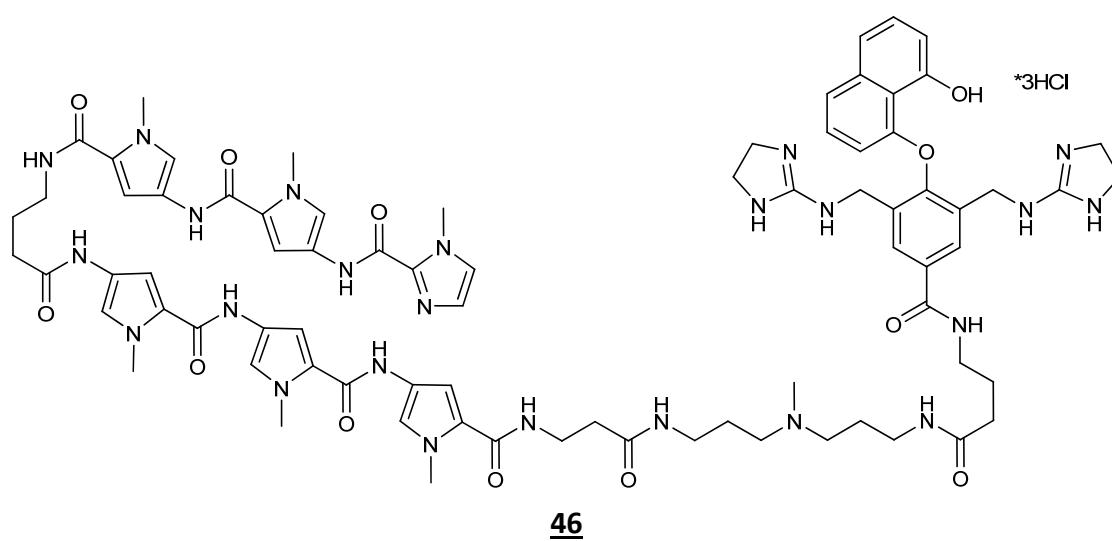
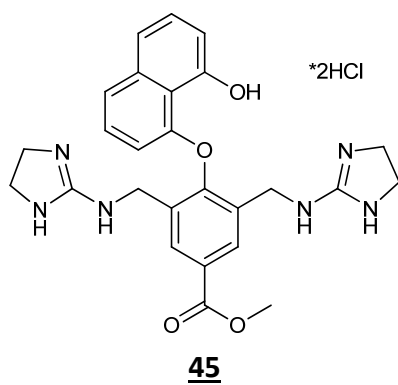
## 5. ZIELSETZUNG

Nachdem aus der dritten Generation von DNA-spaltenden Guanidiniumalkoholen eine Verbindung hervorgegangen ist, die nicht nur Modellphosphate, sondern auch DNA spalten kann, und dabei auch noch ausschließlich die gewünschten O-Phosphate generiert, wurde an der Aufklärung des Spaltmechanismus gearbeitet. Hierbei entstand das Problem, dass bei hunderten oder tausenden von Phosphodiester-Bindungen eines Plasmids die Analytik schwierig und unübersichtlich wurde.

Um aber eine möglichst einfache Analytik zu haben wäre es von Vorteil, statt den vielen potentiellen Spaltstellen einer DNA nur eine oder wenige zu verwenden, was durch eine Sequenzselektivität gewährleistet werden soll. Dazu würde sich vermutlich noch die Affinität zur DNA weiter erhöhen. Diese strukturellen Veränderungen würden die Eigenschaften der bisher bekannten Moleküle noch weiter in Richtung einer künstlichen Nuklease verschieben.

Daher wurden die folgenden Ziele für die vorliegende Arbeit definiert:

- 1) Verbesserung der Synthese des DNA-Spalters **45**, da die bereits vorhandene einige problematische Reaktionen enthält
- 2) Reproduktion der bereits bestimmten Eigenschaften von **45**, wie Aktivität und Sauerstoff-Unabhängigkeit der Spaltung
- 3) Übertragung der Hairpin-Polyamid-Synthese von der festen auf die flüssige Phase um größere Quantitäten zu erreichen und die Probleme der bisherigen Erfahrungen zu umgehen<sup>[100]</sup>
- 4) Herstellung eines geeigneten Linkers und Verknüpfung des sequenzselektiven Polyamids mit dem Spalter **45** zum Zielmolekül **46** (siehe *Abbildung 5-1*) unter Beibehaltung der Spaltaktivität
- 5) Untersuchung von **46** auf Eigenschaften und tatsächlich vorhandene Sequenzselektivität bzw. selektive Spaltung
- 6) Das Zielmolekül soll wenn möglich mit Mannich-Basen derivatisiert (stellt damit ein Analog von **40** dar), und ebenso wie unter Punkt 5) untersucht werden.



**Abbildung 5-1:** Struktur des Bisguanidinium-Alkohols **45** und des angestrebten potentiell sequenzselektiven DNA-Splatters **46**.

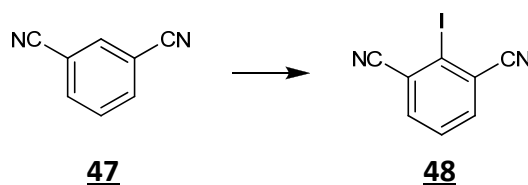
## 6. SYNTHETISCHE ARBEITEN UND RESULTATE

Im Folgenden wird vom Autor die synthetische Arbeit dargestellt, die sich in zwei große Kapitel unterteilt. Das Kapitel 6.1 beschreibt die Synthese der DNA-spaltenden Einheit, während Kapitel 6.2 die Darstellung des Polyamids in flüssiger Phase beinhaltet. In beiden Kapiteln werden die grundlegenden Gedanken und Ideen (sozusagen die Evolution) beschrieben, die letztlich zum erfolgreichen Abschluss führten. Dabei werden auch die Erfahrungen und Besonderheiten geschildert, die sich während der Durchführung der Reaktionen ergaben.

### 6.1 Synthese des DNA-Spalters

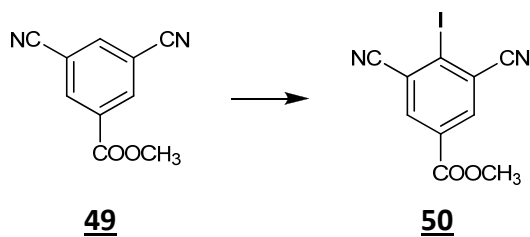
Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits erwähnt wurde, ist in Vorgängerarbeiten<sup>[47]</sup> neben der Erhöhung der Spaltaktivität und –selektivität auch ein Syntheseweg des DNA-Spalters (**38**) ausgearbeitet worden, der es ermöglicht, beliebige Moleküle über z.B. Amid- oder Esterbindungen an das Reagens anzuhängen. Damit sind anschließend auch verschiedene Derivate des DNA-Spalters hergestellt worden, die z.B. ein Acridin oder ein Biotin enthalten, um die Affinität zur DNA weiter zu erhöhen. Um nun weitere Derivate herstellen zu können, muss das Molekül in ausreichender Quantität vorliegen. Die bekannte Synthese birgt hier das Problem, dass eine Schlüsselreaktion (*Abbildung 6-2*) kaum Ausbeute erbringt und das Rohprodukt dazu noch mittels HPLC aufgereinigt werden muss.

Der genannte Schlüsselschritt besteht in der selektiven Deprotonierung und Iodierung eines aromatischen Systems, um in der Folgereaktion einen Dialkohol (in diesem Fall Naphtho-1,8-diol **90**) in einer  $S_NAr$ -Reaktion kuppeln zu können. Enthält dieser Aromat nur die beiden für den späteren Guanidinaufbau benötigten Nitril-Gruppen, funktioniert die Iodierung mit guten Ausbeuten (siehe *Abbildung 6-1*).



**Abbildung 6-1:** Erfolgreiche Iodierung von Isophthalonitril **47** mit ~80 %iger Ausbeute.

Enthält der Aromat aber das für eine spätere Konjugation an z.B. Acridin oder Biotin notwendige Carbonsäure-Derivat, bricht die Ausbeute dramatisch ein und das Rohprodukt muss per HPLC aufgereinigt werden.



**Abbildung 6-2:** Iodierung des Isophthalonitril-Derivates: bei dieser Reaktion erhält man etwa 5-10 % Ausbeute, und muss dazu das Produkt per HPLC reinigen lassen.

Die Iodierung von **49** erwies sich während dieser Arbeit aber in allen Versuchen als unproduzierbar. Mehrere Versuche brachten keinerlei Ausbeute, wobei auch das Edukt nicht reisoliert werden konnte. Da die bekannte Synthese nicht zuverlässig dieses wichtige Molekül liefern konnte, musste eine reproduzierbare Alternative entwickelt werden.

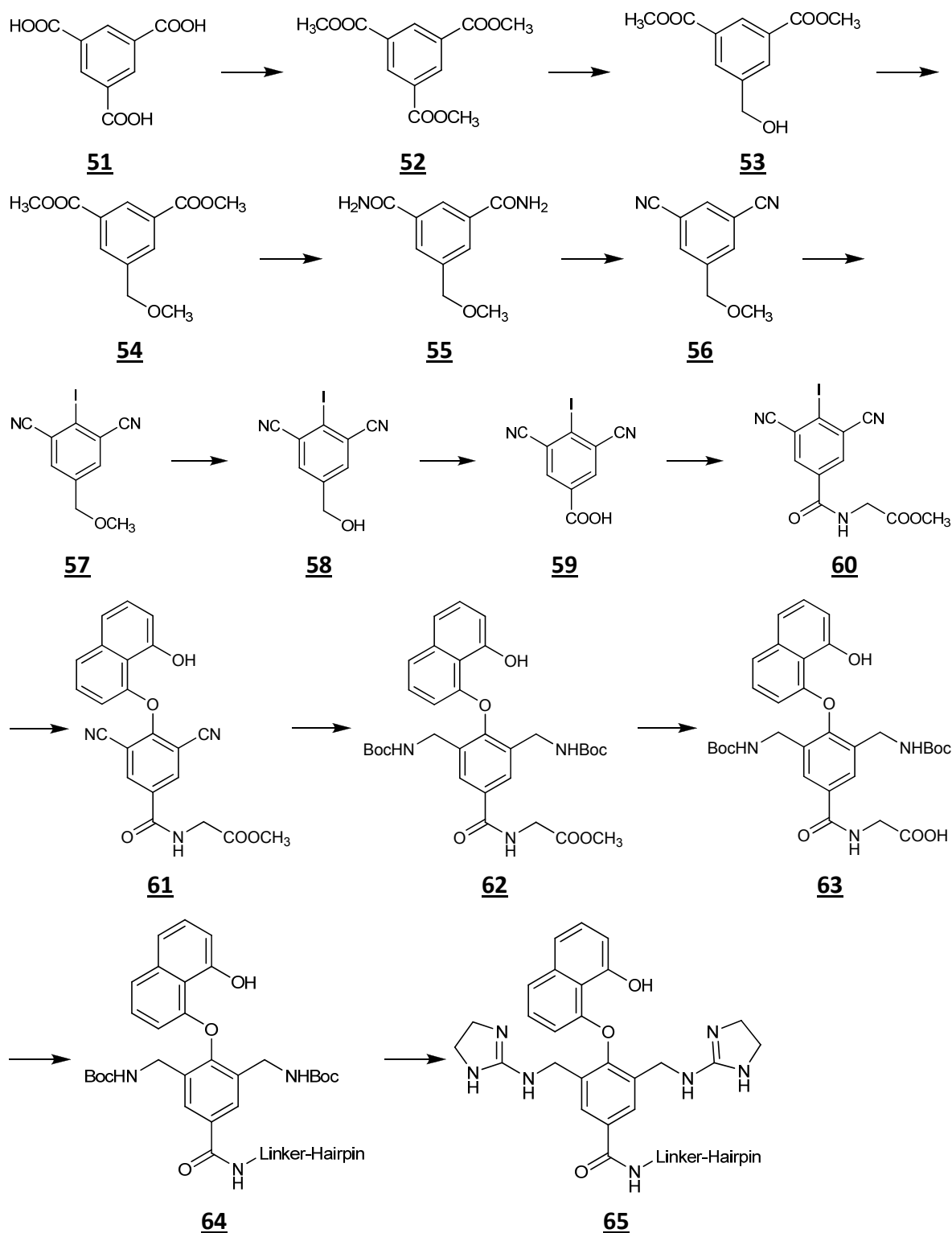
Die Moleküle **47** und **49** unterscheiden sich in der An- bzw. Abwesenheit der elektronenziehenden Carbonsäureester-Funktion. Somit musste diese funktionelle Gruppe für die starke Desaktivierung verantwortlich sein. Ein Vergleich der NMR-Spektren von **47** und **49** zeigte sehr deutlich, dass sich die aromatischen Protonen im Molekül **49** weniger unterscheiden als im Isophthalonitril **47**.

Als Ausweg erschien die Umwandlung der elektronenziehenden in eine elektronenschiebende Gruppe via  $\text{LiAlH}_4$ -Reduktion auf der Stufe des 1,3,5-Benzoltricarbonsäure-trimethylesters **52**. Dieser Weg ist in Synthese-Schema 1 beschrieben (siehe hierzu *Abbildung 6-3*).

### 6.1.1 Synthesestrategie 1

#### 6.1.1.1 Planung

Das Ausgangsmolekül 1,3,5-Benzoltricarbonsäure **51** wird zunächst unter Schwefelsäurekatalyse in den Trimethylester **52** überführt und dann unter Verwendung von  $\text{LiAlH}_4$  zum Monoalkohol **53** reduziert. Nach Schützung der Alkohol-Funktion als Methylether **54** werden dessen Ester-Gruppen in flüssigem  $\text{NH}_3$  unter Druck in das Bisamid **55** überführt, welches dann mit  $\text{POCl}_3$  zum Bisnitril **56** dehydratisiert wird. Nach Deprotonierung mit LDA zwischen den beiden Nitrilen erfolgt eine Iodierung zu **57**, um später an dieser Stelle das Naphtho-1,8-diol einführen zu können. Zuvor wird aber noch der Methylether mit  $\text{BBr}_3$  gespalten, und der Alkohol **58** mit einem geeigneten Oxidationsmittel zur Carbonsäure **59** oxidiert.



**Abbildung 6-3:** Synthesestrategie 1 ausgehend von 1,3,5-Benzoltricarbonsäure und Methoxyether-Verwendung als Schutzgruppe (14 Stufen ohne Polyamid-Synthese).

Über eine Amidkupplung mit Glycinmethylester wird die Carbonsäurefunktion geschützt und das Molekül **60** gleichzeitig für die Kupplung mit dem Polyamid vorbereitet.

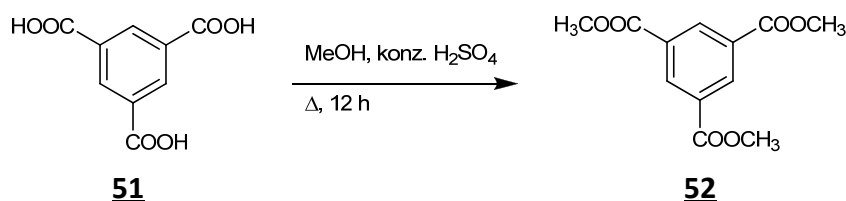
In einer  $S_NAr$ -Reaktion wird nun das Iod gegen Naphtho-1,8-diol ersetzt, die beiden Nitrile von **61** unter  $H_2$ -Druck in das Amin umgewandelt und sogleich mit  $Boc_2O$  geschützt. Nach der

Verseifung der Ester-Funktion von **62** wird dann mit klassischen Reagenzien wie HBTU das Hairpin-Polyamid (zur Synthese des Hairpin-Polyamids siehe Kapitel 6.2) gekuppelt. Zuletzt folgt die Entfernung der Boc-Schutzgruppen mit TFA und der Aufbau der Guanidine mit Dihydroimidazoliumsulfonsäure zum Zielmolekül **65**.

### 6.1.1.2 Durchführung

Die Darstellung des Trimethylesters **52** gelang ohne Probleme nahezu quantitativ. Sowohl durch Schwefelsäurekatalyse in siedendem Methanol (*Abbildung 6-4*) als auch durch Aktivierung mit Thionylchlorid als Säurechlorid (*Abbildung 6-5*) ließen sich exzellente Ausbeuten erzielen.

Für die Ester-Synthese unter Schwefelsäure-Katalyse löst man das Edukt in Methanol, fügt dann die Säure hinzu und refluxiert für 12 h.



**Abbildung 6-4:** Tricarbonsäureester-Darstellung unter Schwefelsäure-Katalyse.

Zur Aktivierung der Tricarbonsäure als Säurechlorid wird der Feststoff in Thionylchlorid suspendiert, etwas abs. DMF hinzugegeben (ohne DMF läuft keine Reaktion ab) und dann zwei Stunden zum Sieden erhitzt. Die heiße, gelbe Lösung wird dann in gekühltes Methanol getropft.

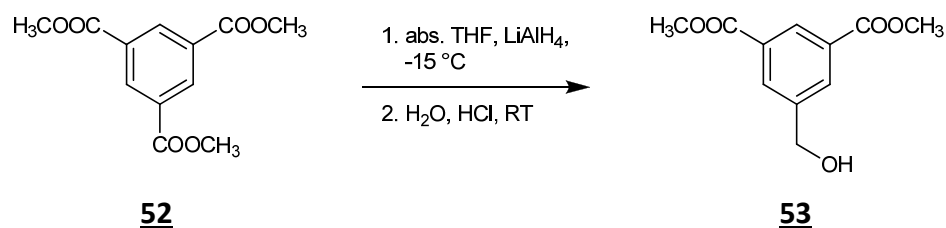


**Abbildung 6-5:** Tricarbonsäureester-Darstellung durch SOCl<sub>2</sub>-Aktivierung.

Die Reduktion zu **53** konnte mit einer Ausbeute von ~65 % durchgeführt werden. Hierzu wird das Edukt in abs. THF gelöst und in der Kälte portionsweise mit LiAlH<sub>4</sub>-Pulver versetzt. Man muss hierbei den Reaktionsfortschritt jedoch in Intervallen via DC überprüfen, um nicht das zweifach-reduzierte Nebenprodukt zu erhalten.

Ein Gemisch aus Produkt und Nebenprodukt ist (außer durch HPLC) säulenchromatographisch kaum aufzureinigen, da beide Moleküle einen sehr ähnlichen R<sub>F</sub>-Wert besitzen.

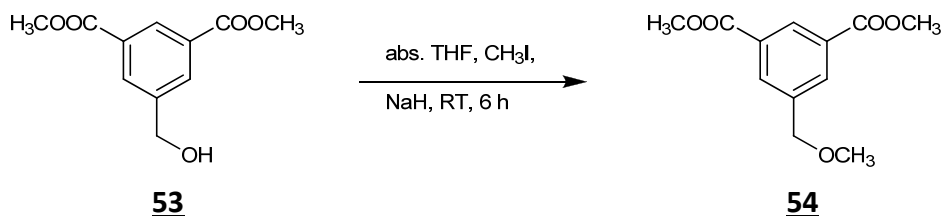
Daher wird über die DC-Kontrolle der Zeitpunkt bestimmt, wenn sich das Nebenprodukt zu bilden beginnt.



**Abbildung 6-6:** Reduktion einer von drei Esterfunktionen mit  $\text{LiAlH}_4$ .

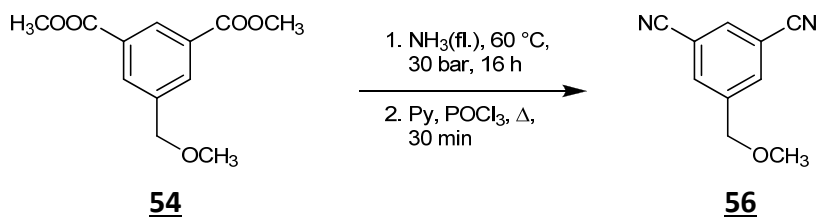
Die bei der Aufarbeitung von  $\text{LiAlH}_4$ -Reduktionen üblicherweise anfallenden Feststoffe konnten durch die ausgearbeitete Prozedur komplett vermieden werden.

Die Einführung der Alkohol-Schutzgruppe zu **54** gelang ohne Probleme und mit guten Ausbeuten über eine Williamson'sche Ethersynthese. Wieder wird das Edukt in abs. THF gelöst und mit Methyljodid versetzt. Danach wird einfach  $\text{NaH}$  als Base zugegeben und gerührt. Nach einem Zeitraum von 4 h kann die Reaktion auf Vollständigkeit kontrolliert und gegebenenfalls nochmals  $\text{NaH}$  zugegeben werden. Testreaktionen mit Methyljodid einerseits und Dimethylsulfat andererseits zeigten, dass sich Methyljodid für diese Reaktion besser eignet, da sich die spätere Aufarbeitung in der Praxis wesentlich einfacher gestaltet.



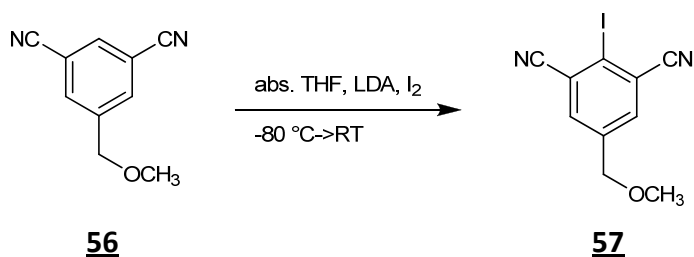
**Abbildung 6-7:** Schützung der Alkohol-Funktion von **53** durch eine Williamson'sche Ethersynthese.

Die Amid-Synthese in flüssigem Ammoniak und die anschließende Dehydratisierung in siedendem Pyridin mit  $\text{POCl}_3$  zum Bisnitril **56** funktionierte analog zur beschriebenen Prozedur<sup>[47]</sup>.



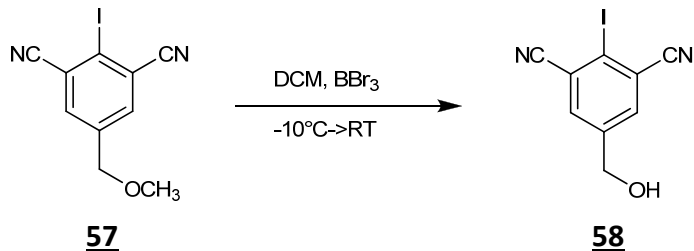
**Abbildung 6-8:** Umwandlung der Ester-Gruppen in Nitrile via Amid-Synthese und anschließender Dehydratisierung mit Phosphoroxychlorid.

Die nun folgende Iodierung zu **57** gelang - wie erwünscht - mit besseren Ausbeuten als 5 %, erreichte jedoch bei weitem nicht die 80 % Ausbeute wie im Falle von Isophthalsäuredinitril, sondern war mit bestenfalls ~ 30 % immer noch nicht zufrieden stellend. Hinzu kam, dass die  $R_f$ -Werte von Edukt und Produkt wieder sehr ähnlich sind, und sich das Produkt nur durch säulenchromatographische Aufreinigung und anschließendem mehrfachen Umkristallisieren elementaranalysenrein erhalten ließ.



**Abbildung 6-9:** Iodierung mit LDA und  $\text{I}_2$  zu **57**. Die Reaktion funktioniert besser als die analoge mit dem Ester als Substituent (para zu Iod).

Die Spaltung des Ethers zu **58** ließ sich mit  $\text{BBr}_3$  durchführen, wobei DC-Analysen und NMR-Untersuchungen deutliche Mengen eines unpolaren Nebenproduktes zeigten, was natürlich die Gesamtausbeute weiter reduziert.



**Abbildung 6-10:** Erfolgreiche Etherspaltung mit  $\text{BBr}_3$ , jedoch mit einem großen Anteil Nebenprodukt.

Hinzu kam noch, dass bei den klassischen Bedingungen wie DCM als Lösungsmittel und  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  auch nach Stunden keinerlei Umsatz nachzuweisen war. Die Reaktion setzte erst bei ca.  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  ein.

Eine anschließende Oxidation mit  $\text{PDC}/\text{H}_5\text{IO}_6$  zu **59** ließ sich ohne Probleme durchführen.

Da der gewonnene Ausbeutezuwachs der modifizierten Iodierung zu **57** durch die problematische Etherspaltung zu **58** wieder aufgehoben wurde (und die Synthese insgesamt 4 Stufen länger wurde (vgl. Z. Nazir<sup>[47]</sup>), sollte eine andere Schutzgruppe verwendet werden, die einfacher abzuspalten ist.

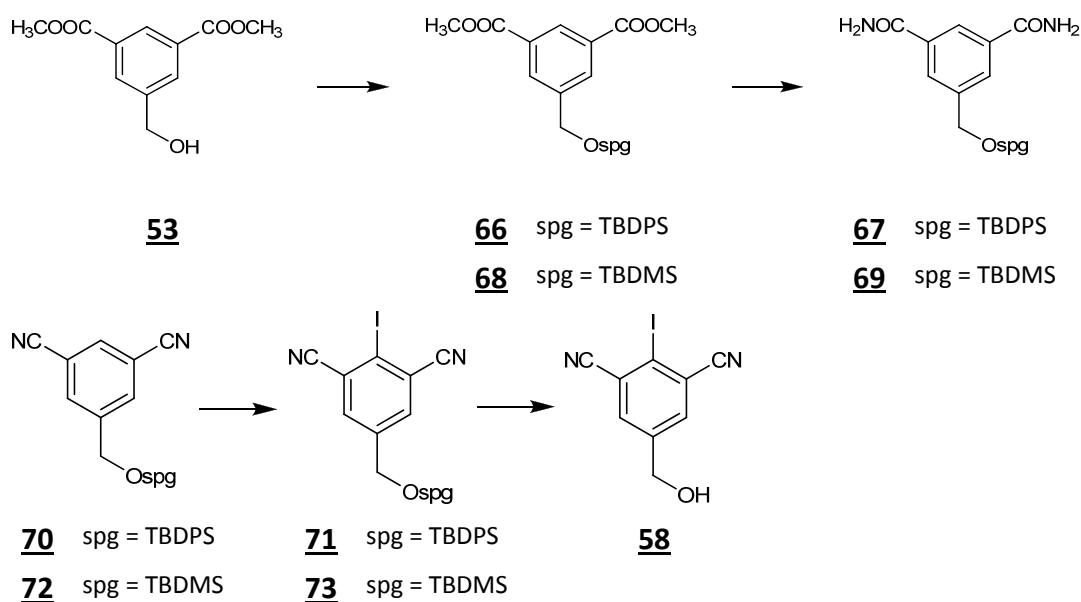


## 6.1.2 Synthesestrategie 2

### 6.1.2.1 Planung

Aus den oben genannten Gründen wurde versucht, eine Silylschutzgruppe (spg) einzuführen, welche unter deutlich milderen Bedingungen (TBAF oder HF/Pyridin) wieder zu Entfernen sein sollte (siehe hierzu *Abbildung 6-11*).

Die Alkohol-Gruppe des Moleküls **53** wird zunächst mit Imidazol als Base/Aktivator als TBDPS-Ether **66** geschützt und dann wie in Strategie 1 mit flüssigem  $\text{NH}_3$  unter Druck in das Bisamid **67** überführt. Aus diesem Molekül soll dann analog mit  $\text{POCl}_3$  das Bisnitril **70** dehydratisiert werden.



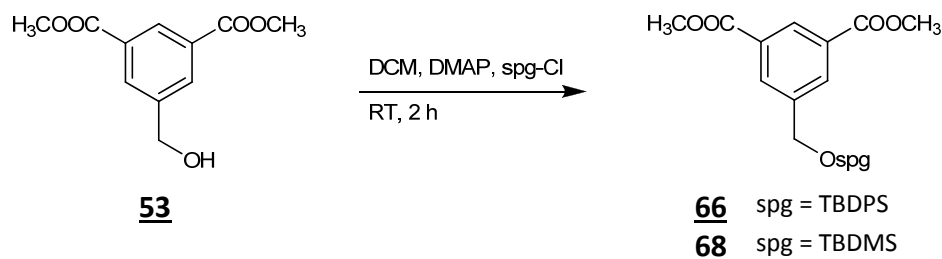
**Abbildung 6-11:** Synthesestrategie 2 mit Verwendung von Silylethern als Schutzgruppe (14 Stufen ohne Polyamid-Synthese).

Bei der folgenden Deprotonierung mit LDA und Iodierung zu Verbindung **71** ist eine Schützung der Alkohol-Funktion noch erforderlich, kann aber danach mit HF/Pyridin oder ähnlichen Reagenzien entfernt werden, um Molekül **58** zu erhalten. Ab hier sollte dann wieder Strategie 1 verfolgt werden, um Zielmolekül **65** darzustellen.

Auf dem selben Wege sollte als Alternative die TBDMS-Schutzgruppe getestet werden (siehe hierzu ebenfalls *Abbildung 6-11*).

### 6.1.2.2 Durchführung

Der Einsatz von Imidazol in der Reaktion zu **66** bzw. **68** als Base/Aktivator führte zu keinerlei Umsatz. Die Schützung des Alkohols gelang in beiden Fällen erst unter Verwendung von DMAP, wobei sich das TBDMS-geschützte Produkt **68** besser handhaben ließ, da es leicht als Feststoff zu gewinnen war, während das TBDPS-geschützte Produkt **66** immer als zähes, hochviskoses Öl vorlag.



**Abbildung 6-12:** Einführung zweier alternativer Silylschutzgruppen. Diese beiden Silyl-Gruppen unterscheiden sich im Grad der Säure-Labilität.

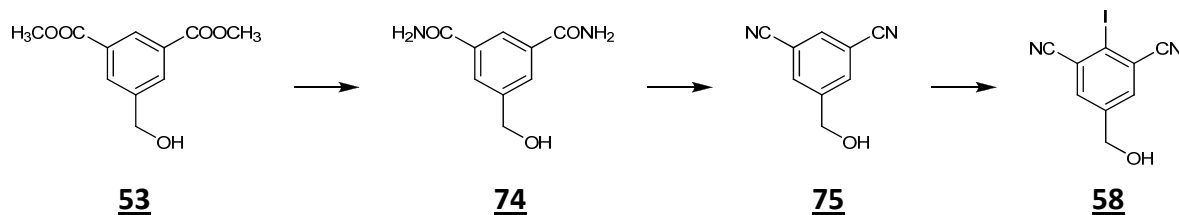
Die Ausbeute war damit im Falle von **66** nicht zu bestimmen, da das Öl immer Reste von Lösungsmitteln und TBDPS-Cl enthielt (wie in NMR-Spektren deutlich zu sehen war). Erst nach Wochen kristallisierte langsam ein farbloses Produkt aus. Molekül **68** hingegen war in guten Ausbeuten zugänglich.

Die Synthesestrategie 2 scheiterte letzten Endes daran, dass sich bei der Amid-Synthese zu **67** bzw. **69** ein klebriges, hochviskoses Produkt bildete, was in den gängigen Lösungsmitteln unlöslich war und sich somit als ein unpraktikabler Weg herausstellte. Nach diesen Erfahrungen wurde diese Route aufgegeben.

## 6.1.3 Synthesestrategie 3

### 6.1.3.1 Planung

Ein Blick auf die generelle Synthesestrategie machte klar, dass der Alkohol **53** spätestens vor der Dehydratisierung mit Phosphorylchlorid geschützt werden muss, damit er nicht in das Chlorid überführt wird. Es kam dann die Frage auf, ob die Alkohol-Schutzgruppe zwingend auf früheren Synthesestufen eingeführt werden muss, oder ob man *in situ* vor der Dehydratisierung schützen kann (siehe hierzu *Abbildung 6-13*).



**Abbildung 6-13:** Planung einer Synthese ohne Verwendung von Alkohol-Schutzgruppen (12 Stufen ohne Polyamid-Synthese).

Geplant war nun, Verbindung **53** auf gewohntem Wege herzustellen und im Anschluss mit ungeschützter Alkohol-Funktion in das Amid **74** umzuwandeln. Das Amid soll dann *in situ* mit TMS-Cl geschützt und direkt danach mit  $\text{POCl}_3$  zum Bisnitril **75** dehydratisiert werden, wobei die Schutzgruppe bei der sauren Aufreinigung automatisch wieder abgespalten werden sollte. Um dann die iodierter Verbindung **58** darzustellen wird wiederum *in situ* geschützt und mit LDA wie bereits beschrieben deprotoniert. Mit diesem Molekül in der Hand sollte dann die Synthese zu Zielmolekül **65** wie unter Strategie 1 weiter durchgeführt werden.

#### 6.1.3.2 Durchführung

Das Amid **74** ließ sich wie erwartet nach der gängigen Prozedur in flüssigem Ammoniak darstellen. Die Dehydratisierung zum gewünschten Produkt **75** war jedoch nicht möglich, da das Amid **74** absolut unlöslich war und nicht *in situ* mit TMS-Cl reagierte.

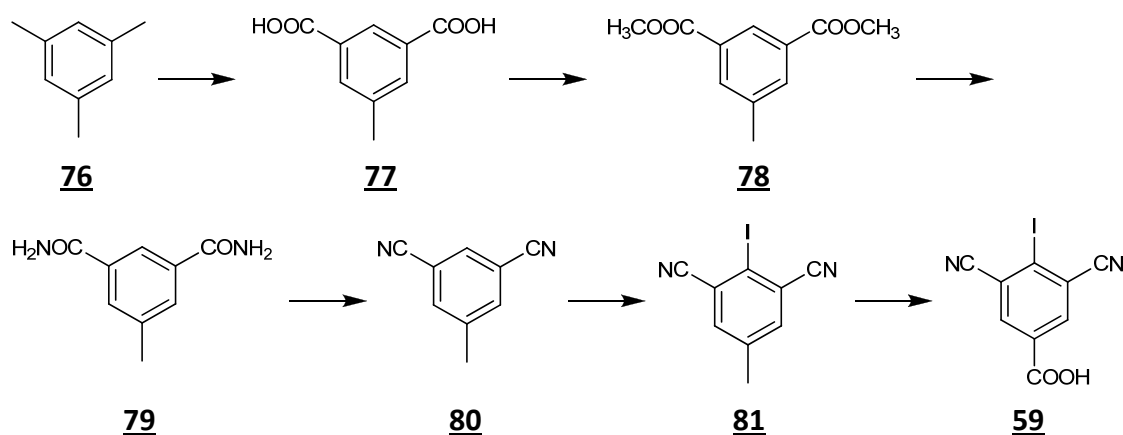
Damit hatte sich auch diese Alternative als unbrauchbar erwiesen.

#### 6.1.4 Synthesestrategie 4

##### 6.1.4.1 Planung

Da die Synthese mit einem Alkohol als funktionelle Gruppe sehr viele Probleme mit sich brachte, wurde dann nach einem Weg gesucht, Alkohol-Schutzgruppen komplett zu umgehen. Hierzu gehörte die Überlegung, von einem anderen Molekül als 1,3,5-Benzol-tricarbonsäure zu starten.

Ein Versuch bestand darin, 2 der 3 Methylgruppen von Mesitylen mit  $\text{KMnO}_4$  zu Carbonsäuren zu oxidieren, um frühzeitig eine Unterscheidung der verschiedenen Substituenten zu haben. Die Carbonsäure-Gruppen sollten dann wie bisher beschrieben über Ester **78** und Amid **79** in das Nitril **80** überführt und zu **81** iodiert werden. Nach Oxidation der letzten Methylgruppe von **81** kann man mit **59** wieder auf die bereits beschriebene Synthese einschwenken.



**Abbildung 6-14:** Umgestellte Synthese des DNA-Splatters mit Mesitylen **76** als Ausgangsmolekül.

#### 6.1.4.2 Durchführung

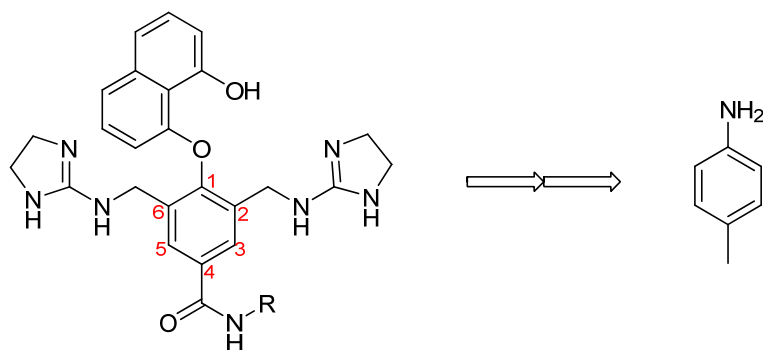
Die Reaktion mit 4eq  $\text{KMnO}_4$  lieferte jedoch die Tricarbonsäure **51** statt der erwarteten Dicarbonsäure **77**. Die Reaktion wurde dann erneut durchgeführt, diesmal jedoch mit 2, 1 und 0.5 eq. Jedes Mal wurde wieder die Tricarbonsäure **51** gebildet. Damit war auch diese Route nicht Erfolg versprechend und wurde nicht weiter verfolgt.

### 6.1.5 Synthesestrategie 5: Veränderung des Substitutionsmusters des Edukts

#### 6.1.5.1 Planung

Die iodierter Verbindung **59** stellte nach wie vor das Schlüsselmolekül dar, und weil nach all den bisherigen Erfahrungen das 1,3,5-Benzol-Substitutionsmuster als Ausgangsstrukturmotiv zu viele Probleme während der Synthese mit sich brachte und die Mesitylen-Oxidation zur Dicarbonsäure nicht gelang, wurde ein gänzlich neuer Weg ausgearbeitet, um das vierfach substituierte Benzol-Derivat zu erhalten.

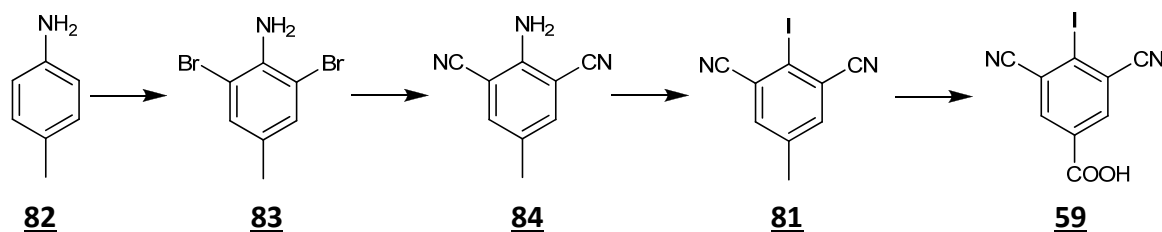
Die Zielstruktur besteht aus einem 4-fach substituierten Benzol-Ring mit phenolischem Kern, wobei die beiden *ortho*-Substituenten identisch sind. Es erscheint als ein guter Weg, von einem Molekül auszugehen, welches bereits *para*-substituiert ist und eine *ortho*-dirigierende Gruppe trägt.



**Abbildung 6-15:** Die retrosynthetische Zerlegung des Bisguanidinium-Alkohols führt zu *para*-Toluidin **82** als Startmolekül.

Dieser neue Weg reduziert die Anzahl der nötigen Stufen auf 10 und beseitigt die Probleme der Selektivität und der Iodierungsausbeute (siehe *Abbildung 6-16*).

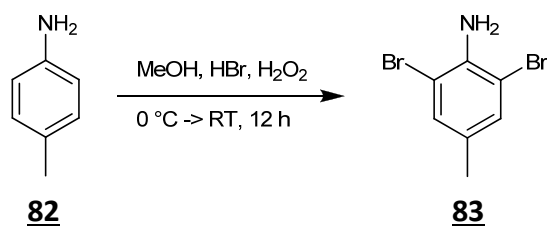
Ausgehend von *para*-Toluidin **82** wird zunächst zweifach in *ortho*-Position zur Aminogruppe bromiert, womit schon nach der ersten Stufe das benötigte vierfache Substitutionsmuster aufgebaut ist. Aus der Dihalogen-Verbindung **83** wird in einer Rosenmund-von-Braun-Reaktion das Bisnitril **84** dargestellt und anschließend einer Sandmeier-Reaktion unterzogen, um das iodierte Molekül **81** zu erhalten. Die Methylgruppe wird dann zur Carbonsäure **59** oxidiert. Ab dieser Stufe stimmt die Synthese wieder mit Strategie 1 überein.



**Abbildung 6-16:** Syntheschema ausgehend von *p*-Toluidin **82** ohne Verwendung von Schutzgruppen (10 Stufen ohne Polyamid-Synthese).

### 6.1.5.2 Durchführung

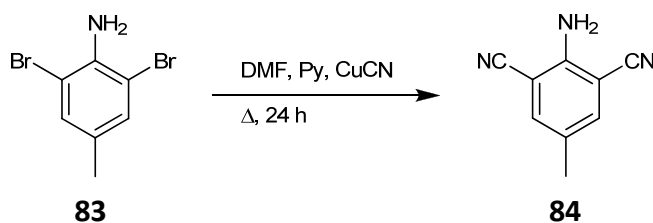
Die zweifache Bromierung zu **83** nach einer Vorschrift von Vyas *et al.*<sup>[101]</sup> ließ sich im größeren Maßstab sehr einfach durchführen. Das benötigte Br<sub>2</sub> wird hier *in situ* hergestellt und reagiert sofort ab. Der Versuch, den Überschuss an Br<sub>2</sub> nach beendeter Reaktion mit Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> zu reduzieren, führte zu massiven Ausbeuteverlusten und einer Erschwerung der Aufreinigung. Aus diesem Grund wurde die Variante gewählt, das Produkt mit H<sub>2</sub>O komplett auszufällen und abzufiltrieren, was ein sehr reines Produkt in hoher Ausbeute (bis zu 95 %) liefert.



**Abbildung 6-17:** Doppelte Bromierung in *ortho*-Position zu  $\text{NH}_2$ . Das Brom wird hierbei in situ hergestellt und nicht schon in elementarer Form zugegeben.

Bei zu großen Verunreinigungen kann das Produkt aus Ethanol umkristallisiert werden. Es ist anzunehmen, dass sich diese Reaktion zu noch größeren Ansätzen skalieren lässt.

Die anschließende Rosenmund-von-Braun-Reaktion zum Bisnitril **84** war ebenso problemlos durchzuführen und lieferte mit bis zu 73% deutlich bessere Ausbeuten als von Detzer in der Literatur<sup>[102]</sup> beschrieben.



**Abbildung 6-18:** In siedendem DMF durchgeführte Rosenmund-von-Braun-Reaktion mit  $\text{Cu(I)CN}$  als  $\text{CN}^-$ -Quelle und Pyridin als Base.

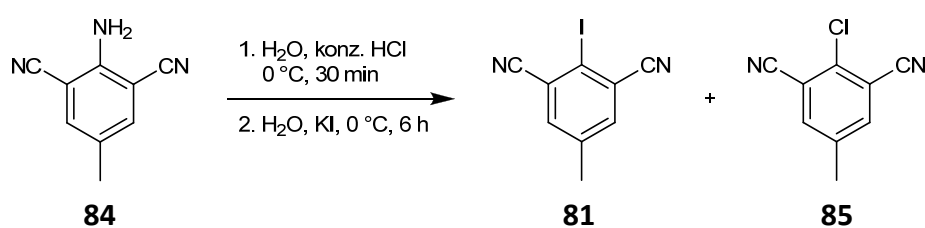
Ein Problem entsteht jedoch dann, wenn man das Erhitzen unterbricht und das DMF auf RT abkühlen lässt. Dann fällt ein schwarz-brauner Feststoff aus, der bei erneutem Erhitzen nicht wieder in Lösung geht. Dies geht mit größeren Ausbeuteverlusten einher. Lässt man die Lösung aber 10 h kontinuierlich refluxieren, entsteht eine orangefarbene Lösung, die wesentlich besser aufgearbeitet werden kann. Bei der Aufarbeitung entstehen am wenigsten Probleme, wenn die noch heiße, aber nicht mehr siedende Lösung langsam in eine eiskalte KCN-Lösung getropft wird, da sonst eine große Menge Feststoff auf einmal ausfällt und wiederum die Ausbeute verringert. Auf jeden Fall muss der Feststoff vor der weiteren Aufarbeitung (Extraktion) abfiltriert werden.

Im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur war es nicht nötig, das Produkt zu sublimieren, denn die säulenchromatographische Aufreinigung führte zu einem EA-reinen Produkt.

Es wurde auch versucht, die Ausbeute durch Verwendung von NMP als Lösungsmittel weiter zu steigern, was aber eine erschwerte Aufarbeitung mit sich brachte und trotz allem die Ausbeute nicht verbesserte.

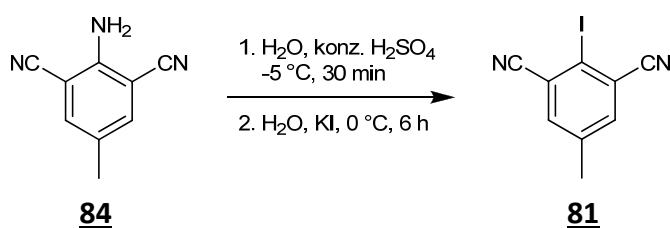
Bei der Sandmeyer-Reaktion nach einer Vorschrift von Clive<sup>[103]</sup> kam zunächst das Problem auf, dass das Edukt **84** in halbkonz. HCl schlecht löslich ist, und die Reaktion dann nur zu unvollständiger Umsetzung führt. Eine Verbesserung der Ausbeute konnte erreicht werden, indem die Suspension vor Beginn der  $\text{NaNO}_2$ -Zugabe für 60 min bei 0 °C gerührt wird. Diese

Prozedur verteilt den Feststoff fein in der wässrigen Lösung und ermöglicht einen nahezu vollständigen Umsatz. Wichtig ist während der Reaktionsführung, dass die Reaktionslösung gut gekühlt bleibt (etwa  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), da andernfalls der Anteil an einem unpolaren und nicht näher charakterisierten Nebenprodukt stark ansteigt. Edukt und Produkt haben sehr ähnliche  $R_f$ -Werte, was die säulenchromatographische Aufreinigung kompliziert machte. Dieses Problem konnte aber gelöst werden, indem ein ternäres Laufmittelgemisch verwendet wurde; hierbei isoliert man zunächst die Iod-Verbindung **81** und kann dann nach Umstellung des Laufmittels noch unverbrauchtes Edukt zurückgewinnen. Bei genauerer Analytik stellte sich heraus, dass neben dem gewünschten iod-haltigen Produkt auch noch ein chlor-haltiges Nebenprodukt entstanden ist.



**Abbildung 6-19:** Sandmeyer-Reaktion: Radikalische Substitution einer  $\text{NH}_2$ -Gruppe (nach Diazotierung) gegen Iod, hier durchgeführt mit konz.  $\text{HCl}$  für die Diazotierung.

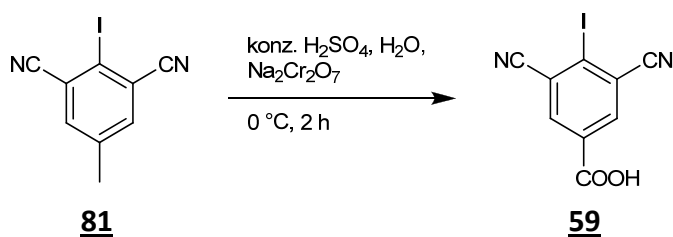
Die Entstehung der chlorierten Verbindung lässt sich auf die verwendete Säure zurückführen (die Produktmischung wurde trotzdem zu Testzwecken in den weiteren Reaktionen eingesetzt, und die einzelnen Komponenten verhielten sich absolut äquivalent). Ein Ausweg wurde durch Verwendung von Schwefelsäure gefunden, wobei nur das gewünschte iodierte Produkt **81** mit Ausbeuten bis 81% entsteht.



**Abbildung 6-20:** Sandmeyer-Reaktion: Substitution einer  $\text{NH}_2$ -Gruppe gegen Iod, in diesem Fall unter Verwendung von konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  für die Diazotierung.

Im zweiten Teil der Reaktion entstehen große Mengen eines braunen Schaumes. Aus diesem Grund ist das Reaktionsgefäß sehr großzügig zu dimensionieren.

Die nun folgende Oxidation von **81** brachte große Schwierigkeiten in Bezug auf Oxidationsreagenz, Reaktionsführung, Extraktion und Aufreinigung mit sich.



**Abbildung 6-21:** Oxidation der Methylgruppe zur Carbonsäure mit  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  als Oxidationsmittel.

Von den getesteten Reagenzien wie Pyridiniumdichromat/ $\text{H}_5\text{IO}_6$ ,  $\text{CrO}_3$ ,  $\text{KMnO}_4$ <sup>[104]</sup>,  $\text{RuCl}_3/\text{NaOCl}$ <sup>[105]</sup>,  $\text{HNO}_3$ <sup>[106]</sup> und  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ <sup>[107,108]</sup>, konnte nur mit letzterem (unter speziellen Bedingungen) das gewünschte Produkt erhalten werden. Außer bei  $\text{HNO}_3$  (Produkt in Spuren nach 4 h Reflux) fand mit den übrigen Reagenzien nicht die erhoffte ( $\text{KMnO}_4$ ) bzw. keine Reaktion statt.

Die größte Schwierigkeit bestand bei dieser Oxidation zunächst darin, das Edukt in Lösung zu bringen; der Versuch der Oxidation in halbkonz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  unter Rückfluss führte auch nach 8 h zu keinem Produkt.

Schon relativ geringe Mengen von Wasser führten dazu, dass das in konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelöste Edukt wieder ausfällt. Daher sollte man das Verhältnis von Schwefelsäure zu Wasser ( $\sim 11:1$ ), in etwa einhalten, damit das Edukt in Lösung bleibt. Auch sollte man das Produkt zunächst in konz. Schwefelsäure lösen und dann unter Eiskühlung langsam das Wasser zutropfen.

Da das Oxidationsreagenz ebenfalls in Wasser gelöst wird, muss man bei Zugabe darauf achten, dass das bereits zugegebene Reagenz komplett verbraucht und ein evtl. ausgefallener Feststoff wieder aufgelöst ist, da andernfalls das Edukt ausfällt und keine weitere Reaktion möglich ist. Über diese Beobachtung erklärt sich der relativ lange Zeitraum des Zutropfens.

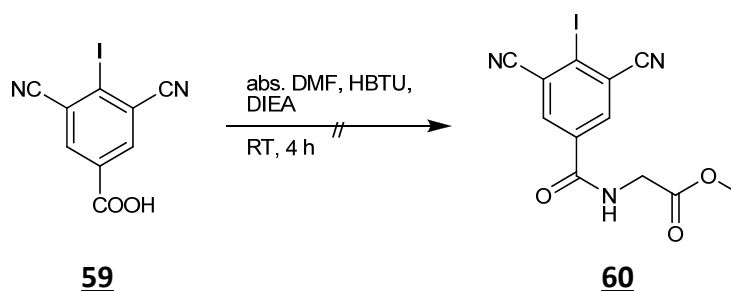
Bei der Extraktion erwies sich EtOAc als Extraktionsmittel der Wahl; mit DCM ließen sich keine guten Resultate erzielen. Die säulenchromatographische Aufreinigung eignet sich in diesem Fall nur, um Edukt und Produkt von eventuellen salzhaltigen Verunreinigungen zu befreien; man kann Edukt und Produkt so nicht von einander trennen, obwohl sich die  $R_f$ -Werte auf dem DC sehr stark unterscheiden.

Obwohl man rechnerisch 1 eq  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  benötigt um eine Methylgruppe zur Carbonsäure zu oxidieren, wird eine vollständige Oxidation sogar mit 3 eq des Oxidationsmittel nicht erreicht.

Es ist daher von Vorteil, das Gemisch (Edukt ist üblicherweise nur noch in geringen Mengen vorhanden) weiter umzusetzen und die endgültige Aufreinigung auf der nächsten Stufe vorzunehmen (alternativ kann man das Produkt zunächst basisch extrahieren, um es in die wässrige Phase zu überführen, und dann mit Säure ausfällen).



Nach der erfolgreichen Oxidation zu **59** sollte Glycinmethylester an die Säurefunktion gekuppelt werden.

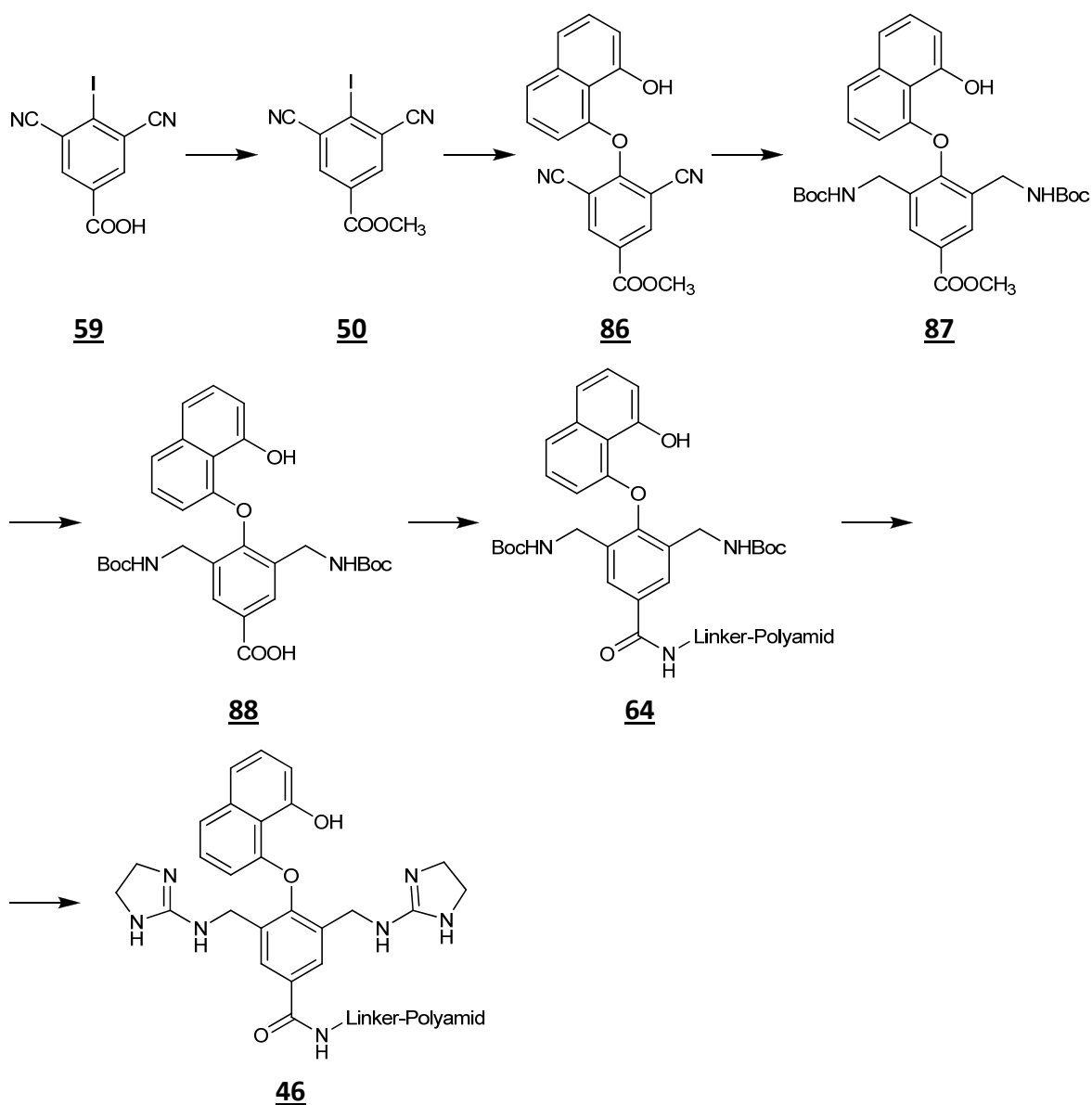


**Abbildung 6-22:** Fehlgeschlagene Amidkupplung mit HBTU und DIEA.

Die Reaktion mit HBTU führte aber nicht zum gewünschten Produkt, und auch Edukt **59** ließ sich nicht mehr zurückgewinnen. Es zeigten sich mehrere Spots bei der DC-Analytik, die via Säulenchromatographie isoliert und massenspektrometrisch analysiert wurden. Keiner der Spots ließ sich dem gesuchten Produkt zuordnen.

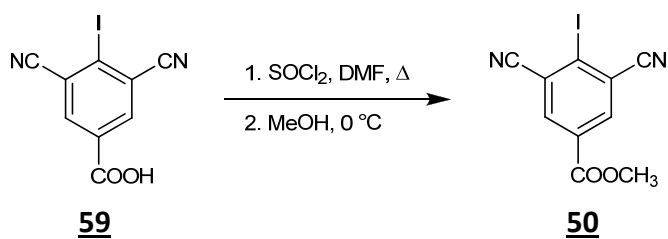
Nachdem die Verbindung **60** auch nach wiederholtem Versuch nicht erhalten werden konnte, wurde an diesem Punkt die Synthese umgestellt: das iodhaltige Molekül **59** sollte zunächst unter klassischen Bedingungen zum Methylester **50** umgewandelt und danach analog zur publizierten Synthese von Z. Nazir in einer  $S_NAr$ -Reaktion zur Naphthol-haltigen Struktur **86** umgesetzt werden.

Im Anschluss werden die Nitril-Gruppen - ebenfalls wie beschrieben - mit Wasserstoff unter Pd/C- und  $PtO_2$ -Katalyse zu den Aminen reduziert und Boc-geschützt. Der Methylester von **87** wird unter milden Bedingungen verseift und das Polyamid über einen geeigneten Linker mit Standard-Reagenzien an die Carbonsäure **88** gekuppelt. In der letzten Reaktion werden die Boc-Schutzgruppen entfernt und die Guanidine aufgebaut, womit dann Zielstruktur **46** fertig gestellt ist (siehe *Abbildung 6-23*). Die neue Zielstruktur unterscheidet sich somit im Linker von **65**.



**Abbildung 6-23:** Umgestellte Synthese zur Darstellung von Zielmolekül **46** ohne Verwendung des Glycin-Spacers.

Zum Aufbau der Methylester-Funktion wurde die Carbonsäurefunktion mit  $\text{SOCl}_2$  zum Säurechlorid umgesetzt, um eine aktivierte Verbindung zu erhalten.

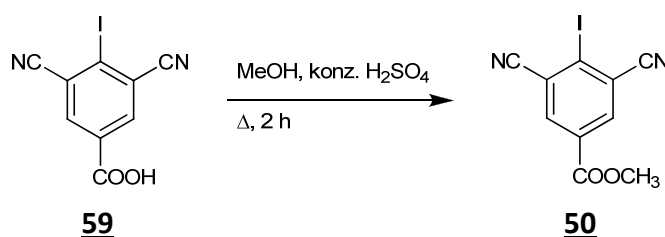


**Abbildung 6-24:** Methylester-Synthese mit vorausgehender Bildung des Säurechlorids.

Das Säurechlorid wird dann in MeOH getropft, woraus man nach Aufreinigung den Methylester **50** erhält.

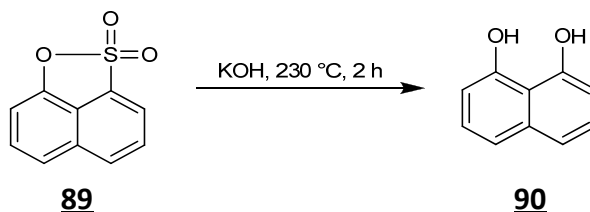
Alternativ lässt sich die Verbindung auch unter Säurekatalyse erhalten. Der Vorteil dieser Variante ist dabei, dass das Produkt nach der Reaktion abfiltriert werden kann und nicht säulenchromatographisch aufgereinigt werden muss. Alternativ kann man das Produkt nach Neutralisation der Reaktionslösung mit EtOAc extrahieren und anschließend via Säulenchromatographie aufreinigen, was zu einem sehr reinen Produkt führt.

Trotzdem lassen sich beide Methoden einsetzen, um **50** mit hohen Ausbeuten bis 94% darzustellen.



**Abbildung 6-25:** Methylester-Synthese unter Schwefelsäurekatalyse.

Für die nun folgende Kupplung benötigt man das Naphtho-1,8-diol **90**, welches nach einer Vorschrift von Barrett<sup>[109]</sup> aus dem Sulton **89** über eine KOH-Schmelze zugänglich ist.



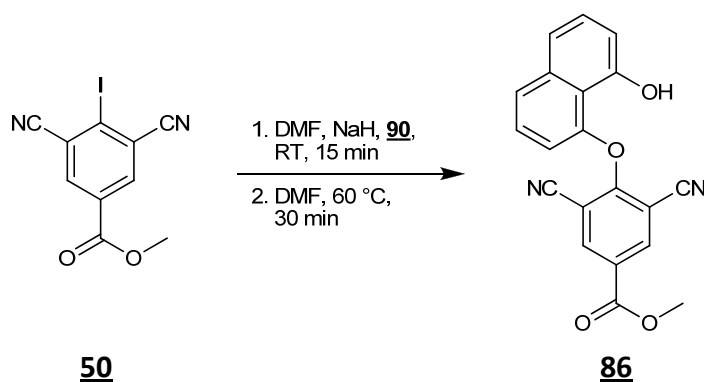
**Abbildung 6-26:** Darstellung des Naphtho-1,8-diols **90** in einer KOH-Schmelze.

Auch diese Reaktion ist leicht durchführbar, wenn auch die Aufarbeitung ein wenig aufwändiger ist. Hier fällt nach der Ansäuerung mit HCl ein schwarzer Feststoff aus, der nur sehr langwierig abzufiltrieren ist. Die anschließende Säulenchromatographie liefert dann aber ein sehr sauberes Produkt mit moderaten Ausbeuten von bis zu 46%.

Das gelbe Pulver dieses Diols verfärbt sich oberflächlich innerhalb von wenigen Wochen in einen braunschwarzen Feststoff, der aber immer noch das selbe NMR zeigt, wie die frisch gereinigte Verbindung. Auf dem DC jedoch sieht man dann einen Produkt-Spot und einen Startfleck (man kann die Verunreinigung sehr gut durch eine Flash-Chromatographie abtrennen und erhält dann wieder **90** als blass gelben Feststoff). Daher sollte das Diol **90** kühl (-20 °C) und unter Argon aufbewahrt werden. Bei diesen Bedingungen war auch nach Monaten der Lagerung keine Verfärbung zu beobachten.

Die nun folgende  $S_NAr$ -Reaktion mit einfach deprotoniertem **90** verläuft analog zu den Beschreibungen von Z. Nazir. Die Reaktion von **50** zu **86** ergab aber aus zunächst unbekannten Gründen keinerlei Ausbeute. Dies war üblicherweise dann der Fall, wenn sich die Reaktionslösung während der Deprotonierung von Diol **90** durch NaH schwarz verfärbte. In diesem Fall ist die Reaktionslösung unbrauchbar und man muss von vorne beginnen. Diese unerwünschte Reaktion konnte aber durch den Einsatz von Vakuum- und Schutzgastechnik und Verwendung von entgasten Lösemitteln vermieden werden, was die Vermutung unterstützt, dass  $O_2$  für die Nebenreaktion verantwortlich ist.

Des Weiteren ist es hilfreich, wenn man NaH im leichten Unterschuss (verglichen mit **90**) in der Reaktion verwendet, denn dies verhindert die Bildung eines weiteren, polaren Nebenproduktes. Nach diesen Änderungen ließ sich die Reaktion weiter hochskalieren, und kann auch im Gramm-Maßstab problemlos durchgeführt werden.

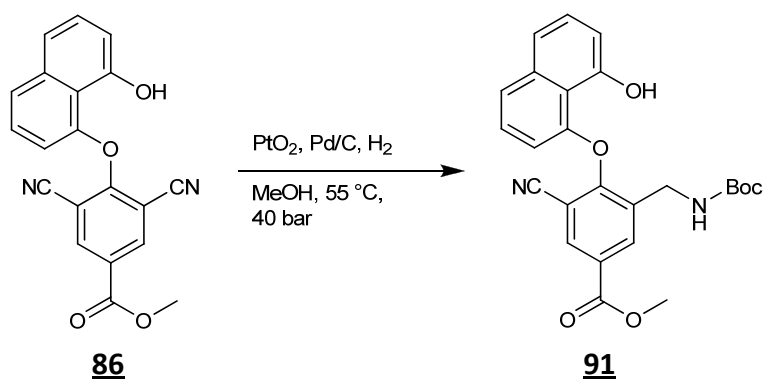


**Abbildung 6-27:** Nucleophile aromatische Substitution mit Naphtho-1,8-diol **90** als Nucleophil.

Bei der Aufarbeitung, die säulenchromatographisch erfolgt, lässt sich das überschüssige Diol **90** (in dieser Reaktion in 1.5 eq eingesetzt) wieder als gelber Feststoff zurückgewinnen, und **86** kann als elementaranalysenreiner Feststoff gewonnen werden. Hierbei werden Ausbeuten von bis zu 70 % erzielt.

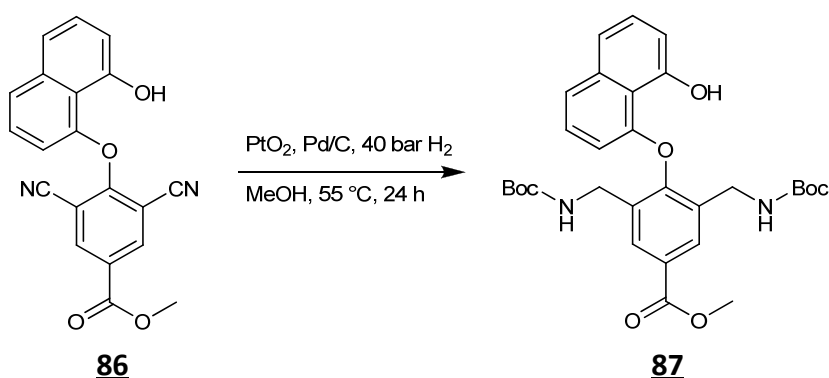
Da auch **86** recht schnell seine Farbe von blaßgelb zu blaßgrau ändert, ist die Lagerfähigkeit als begrenzt zu bewerten. Eine Aufbewahrung unter Argon und in der Kälte ist sinnvoll, wenn man es nicht sofort in der nächsten Reaktion umsetzt.

Die Reduktion von **86** zum doppelt geschützten Diamin **87** verlief zunächst nicht wie beschrieben<sup>[47]</sup>. Unter den bekannten Bedingungen war meist ein Gemisch aus **87** und **91** nachzuweisen, d.h. die Reaktion lief nur selten vollständig ab. Vor allem aber waren mehrere Nebenprodukte bei der DC-Analytik nachweisbar, die aber nicht näher identifiziert wurden. Diese Nebenreaktionen ließen sich durch die Verwendung des wasserfreien  $PtO_2$ -Katalysators komplett unterdrücken.



**Abbildung 6-28:** Unvollständige Reduktion der Nitrile von **86** mit  $\text{H}_2$  unter Katalyse von  $\text{PtO}_2$  und Pd/C. Es bildet sich das einfach-reduzierte Molekül **91**, welches aber noch weiter hydriert werden kann.

Die Verlängerung der Reaktionszeit auf 24 h und kleine Veränderungen der Katalysator-Stöchiometrie lieferten dann in den meisten Fällen annähernd quantitativ das gewünschte Produkt **87**. Der Wasserstoff-Druck sollte nicht höher gewählt werden, da unter noch höheren Drücken der Verlust der Naphthol-Einheit beobachtet wurde, und das Molekül damit seine Aktivität bezüglich der Plasmid-Spaltung verliert.



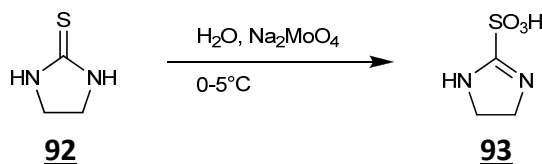
**Abbildung 6-29:** Verbesserte Reduktion der Nitrile von **86** mit  $\text{H}_2$  unter Katalyse von  $\text{PtO}_2$  und Pd/C.

In den Fällen, in denen die Reaktion nach der beschriebenen Zeit nicht komplett beendet war, konnte die Umsetzung durch erneute Zugabe der Katalysatoren und nochmalige Hydrierung für 16 h vervollständigt werden.

Nach Säulenchromatographie erhält man dann das gewünschte Produkt **87** (mit bis zu 69% Ausbeute), wobei es allerdings nicht immer vollständig vom Überschuss  $\text{Boc}_2\text{O}$  abgetrennt wird.

Die Skalierung der Reaktion hin zu höheren Edukt-Mengen ist nicht so ohne weiteres möglich, da schon die Erhöhung um 50 mg eine Verlängerung der Reaktionszeit von min. 8 h notwendig macht. Man kann auch nicht einfach die Menge der Katalysatoren erhöhen, denn die große Menge der Aktivkohle adsorbiert einen Großteil des Produktes.

Um die Guanidin-Gruppen aufzubauen (und damit den DNA-Spalter **45** fertig zu stellen), muss man noch N,N'-Ethylenthioharnstoff **92** zum Sulfonat **93** oxidieren, was mit katalytischen Mengen Natriummolybdat und halbkonz. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durchgeführt werden soll<sup>[110]</sup>.

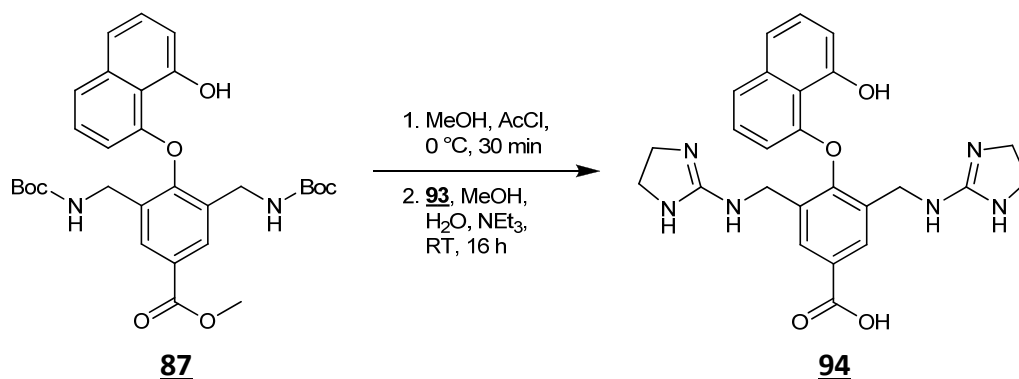


**Abbildung 6-30:** Stark exotherme Oxidation vom Thioharnstoff **92** zum Sulfonat **93** mit Natriummolybdat.

Bei dieser Reaktion ist besonders auf die Temperatur zu achten, da schon wenige Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausreichen, um die Innentemperatur beträchtlich ansteigen zu lassen. So kommt es bei zu schneller Zugabe vor, dass die Lösung stark zu schäumen beginnt und zum Teil auch aus dem Kolben austritt (wenn nicht ausreichend dimensioniert).

Die Durchführung ist daher recht zeitintensiv, weil immer wieder gekühlt werden muss. Man erhält aber nach Beendigung der Reaktion das elementaranalysenreine Produkt **93** mit bis zu 42% Ausbeute einfach durch Filtration und Trocknen im Vakuum.

Die Reaktion zum Bisguanidiniumalkohol **45** verläuft nach dem (noch leichten) Entfernen der Boc-Schutzgruppen nicht so ohne weiteres, wie dies u.a. bei den analogen Strukturen **27**, **33** und **36** in Vorgängerarbeiten gezeigt wurde. Als Grund ist hierfür die Ester-Funktionalität zu nennen, die unter Verwendung der Standard-Reaktionsbedingungen zur freien Carbonsäure **94** hydrolysiert wird:



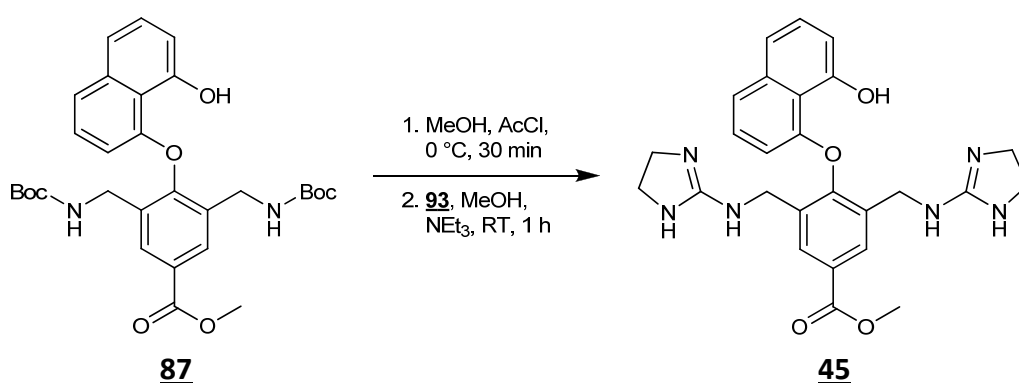
**Abbildung 6-31:** Darstellung des Bis(guanidinium)-Alkohols **94** als freie Carbonsäure.

Als Vorteil von Verbindung **94** soll hier aber erwähnt werden, dass sie leicht durch die Aufreinigungsmethode nach M. Muche<sup>[110]</sup> und anschließenden Ionentausch als doppeltes Chlorid-Salz mit Ausbeuten bis 59% zu erhalten ist.

Um die Ester-Hydrolyse zu umgehen (die Mischung aus MeOH, NEt<sub>3</sub> und H<sub>2</sub>O zeigte einen pH > 12), wurde die Reaktionszeit auf 1 h verkürzt, wonach ein vollständiges Verschwinden des

Eduktes **87** per DC-Analytik gezeigt werden konnte. Aber auch nach dieser verkürzten Reaktion war neben dem gewünschten Bisguanidinium-Alkohol **45** auch schon Molekül **94** nachweisbar. Die Aufreinigung dieser Reaktion nach M. Muche lieferte überraschenderweise quantitativ **94**. Es ist anzunehmen, dass der Ester unter den Extraktionsbedingungen (1n NaOH gegen  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) auch bei den auftretenden kurzen Kontaktzeiten komplett hydrolysiert wird.

Nach diesen Erfahrungen wurde während der nächsten Reaktion zum Guanidin-Aufbau komplett auf Wasser als Co-Solvens verzichtet, da somit das notwendige Nucleophil zur Hydrolyse fehlt. Statt dessen wurde ein 2:1-Gemisch von MeOH und  $\text{NEt}_3$  verwendet.

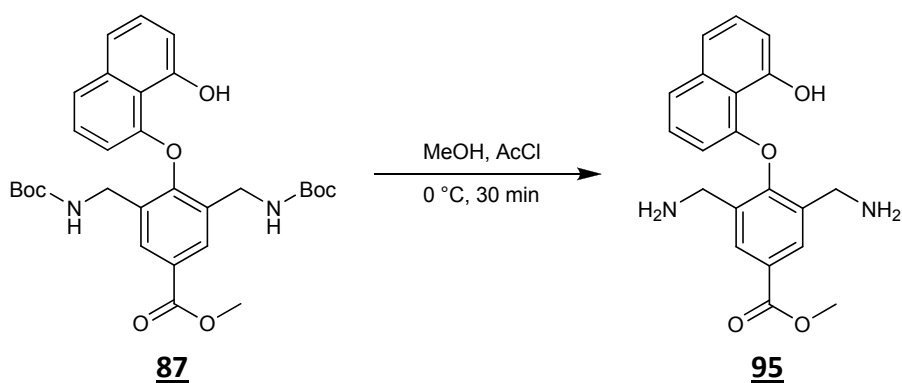


**Abbildung 6-32:** Darstellung des Bis(guanidinium)-Alkohols **45**. Das Lösungsmittelgemisch wurde hier auf  $\text{MeOH}/\text{NEt}_3 = 2:1$  geändert, um die Esterhydrolyse zu verhindern.

Da die Aufarbeitung nach M. Muche ebenfalls schon zur Esterhydrolyse geführt hatte, wurde diesmal die Chromatographie nach Z. Nazir<sup>[47]</sup> durchgeführt. Hier bleibt aber nach Evaporation des Lösungsmittels Essigsäure zurück, und bildet mit **45** das Diacetat-Salz. Das Acetat konnte im Gegensatz zum Pikrat-Salz von **94** nicht durch eine Dowex Ionenaustauscher-Säule in das Chlorid überführt werden.

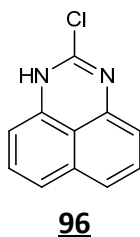
Bisguanidinium-Alkohol **45** zeigte als Acetat-Salz in einem Experiment zur Plasmid-Spaltung leider keinerlei Aktivität. Aus diesem Grund wurde nach einer alternativen Methode zur Umsalzung gesucht. Hierzu wurde **45** in MeOH aufgenommen und mit 2.5 eq Pikrinsäure als Pikratsalz gefällt<sup>[44]</sup>. Dieses Pikrat-Salz lässt sich dann einfach durch eine Ionenaustauscher-Säule mit 53% Ausbeute in das Chlorid-Salz überführen.

Das aus **87** gewinnbare freie Amin stellt ebenso eine interessante Verbindung dar, die leicht durch einfache Umsetzung mit methanolischer, wasserfreier HCl darstellbar ist. Das Bis-Amin **95** fällt immer bei der Entfernung der Boc-Schutzgruppen von **87** an, und liegt nach Evaporation des Lösungsmittels mit Ausbeuten bis 71% als Dihydrochlorid vor.



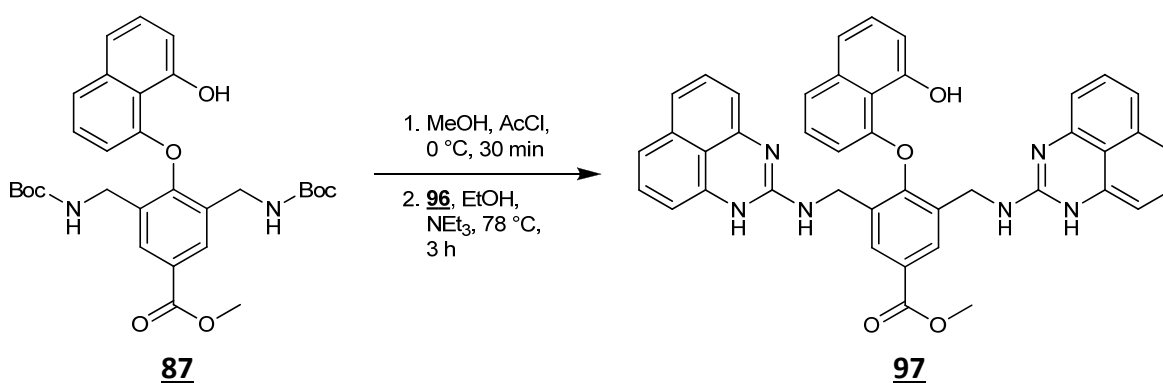
**Abbildung 6-33:** Darstellung des Diamino-Alkohols **95**. Die beiden Amino-Schutzgruppen konnten leicht durch Säure entfernt werden.

Ein weiteres interessantes Zielmolekül für den Einsatz als Spaltreagenz ist ein Derivat von **87**, wenn es mit Chlor-Perimidin **96**<sup>[IV]</sup> umgesetzt wird.



**Abbildung 6-34:** Struktur von Chlor-Perimidin **96**, das als Alternative zum Sulfonat **93** gekuppelt und getestet werden soll.

Die Reaktion, die zur Zielstruktur **97** führt, verläuft analog zur Reaktion in *Abbildung 6-32*. Auch hier wird zunächst wieder entschützt, und das freie Amin dann mit **96** umgesetzt.



**Abbildung 6-35:** Modifizierter DNA-Spalter, bei dem die Guanidine gegen Perimidine ersetzt worden sind.

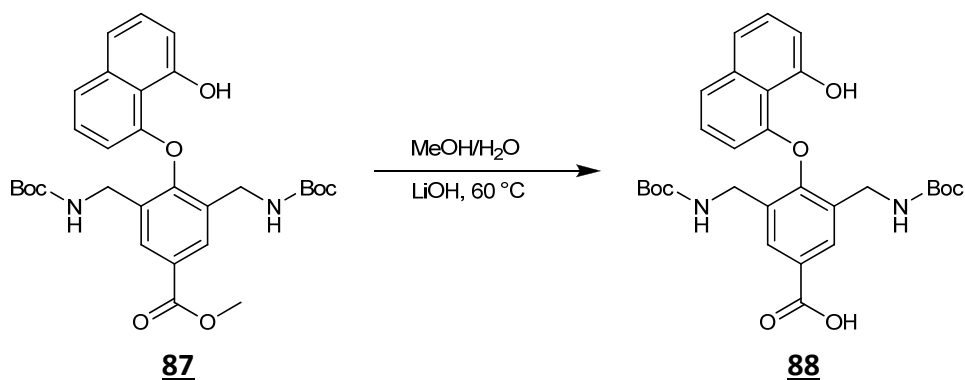
Das Lösungsmittel und die Reaktionstemperatur mussten aber zur erfolgreichen Umsetzung zu **97** verändert werden, da mit der Mischung aus MeOH/H<sub>2</sub>O/NEt<sub>3</sub> kein Produkt zu erhalten

<sup>IV</sup> Das Chlor-Perimidin wurde mir freundlicherweise vom Herrn Dipl.-Chem. M. Zeiger zur Verfügung gestellt



war. Auch mit abs. MeOH und DIEA war die gewünschte Reaktion nicht zu beobachten. Erst der Einsatz von abs. EtOH und TEA unter Reflux-Bedingungen führte zum Bisperimidin **97**. Der erste Schritt der Aufreinigung erfolgte per Chromatographie, um den Überschuss von **96** abzutrennen. Ein reines Produkt konnte erst nach semipräparativer HPLC-Trennung und anschließendem Ionentausch erhalten werden. Anzumerken ist jedoch, dass trotz allem keine korrekte EA erhalten werden konnte. Die erreichte Ausbeute betrug hier maximal 57%.

Um das sequenzselektive Zielmolekül **46** fertig zu stellen, muss der Ester von **87** hydrolysiert werden. Diese Reaktion verlief unproblematisch nach Vorschrift<sup>[47]</sup>, und konnte auch nach dieser aufgereinigt werden (Ausbeuten hier bis zu 88%). Ein elementar-analysenreines Produkt ließ sich so aber nicht erhalten.



**Abbildung 6-36:** Milde alkalische Verseifung von **87** mit LiOH in methanolischem Wasser.

Verbindung **88** kann dann per Amid-Formation an das entschützte Polyamid **138** gekuppelt werden (siehe hierzu Seite 86).

## 6.2 Synthese des Hairpin-Polyamides

Bei der in meiner Diplomarbeit durchgeführten Festphasensynthese trat eine ganze Reihe von Problemen auf, die gelöst werden mussten:

- das publizierte Protokoll für die manuelle Festphasensynthese hat keine zufrieden stellenden Resultate erbracht und musste annähernd komplett geändert werden
- Entfernung der  $\text{NH}_2$ -Schutzgruppe nicht ohne weiteres quantifizierbar
- Standard-Nachweise auf freie Amino-Gruppen (wie z.B. Kaiser-Test u.a.) funktionieren bei den verwendeten  $\gamma$ -Aminosäuren nicht
- HPLC-Überwachung der einzelnen Kupplungen auf Vollständigkeit umständlich und sehr zeitintensiv
- bei Verwendung von weniger als 4 eq des Monomers wird nur eine sehr geringe Kupplungsausbeute erreicht
- teure Kupplungsreagenzien wie z.B. HBTU notwendig
- keine Analytik der Zwischenstufen
- lange Dauer der Abspaltung des Produktes vom festen Träger
- nach aufwändiger HPLC-Trennung nur geringe Mengen des Produkts.

Aus diesen Gründen sollte die Polyamid-Synthese auf die flüssige Phase übertragen werden<sup>[111]</sup>, wobei die Vorteile gegenüber dem Nachteil der längeren Synthesedauer überwiegen sollten, sobald ein geeignetes Protokoll erst einmal ausgearbeitet ist. Die Idee der Flüssigphasensynthese ist auch von Lee et. al.<sup>[112]</sup> aufgegriffen und im Jahr 2007 kurz vor Beendigung der vorliegenden Arbeit publiziert worden.

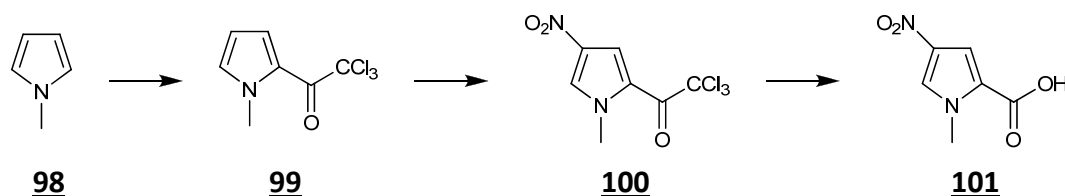
### 6.2.1 Strategie 1

Die von P. B. Dervan ausgearbeiteten Monomere für die Festphasensynthese beruhen auf Boc- oder Fmoc-Schutzgruppen und sind über 7- respektive 5-stufige Synthesen (Boc-Monomere)<sup>[113]</sup> bzw. über 6-stufige Synthesen (Fmoc-Monomere)<sup>[114]</sup> zugänglich. Dieser hohe präparative Aufwand sollte für die Synthese in flüssiger Phase stark reduziert werden. Auch die von Y. Tor publizierte veränderte Synthese<sup>[115]</sup> aus dem Jahr 2004 war für die geplanten Zwecke immer noch zu aufwändig.

Da die benötigten  $\gamma$ -Aminosäuren für die Festphasensynthese andere Eigenschaften aufweisen müssen als für die Synthese in flüssiger Phase, wurde ein Weg gesucht, den präparativen Aufwand stark zu verringern.

Wie bei der publizierten Synthese von P. B. Dervan ist auch bei der hier vorliegenden das N-Methylpyrrol **98** Ausgangspunkt, welches im ersten Schritt in 2-Position zu **99** acetyliert wird.

In der nächsten Reaktion wird Molekül **100** durch Nitrierung in 4-Position aufgebaut, und dann die Carbonsäure **101** über eine Haloform-Reaktion dargestellt, womit das Monomer auch schon für die Polyamid-Synthese einsatzbereit ist (siehe *Abbildung 6-37*).

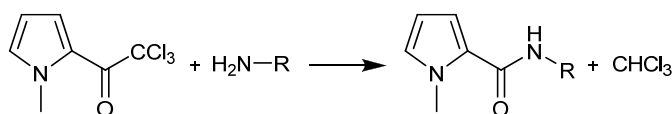


**Abbildung 6-37:** Synthese des Py-Monomers mit den für eine Polyamid-Synthese erforderlichen funktionellen Gruppen.

Wie ersichtlich ist wird die Amino-Funktion gar nicht erst aufgebaut, sondern auf der Stufe der Nitro-Gruppe belassen, welche eine „verkappte“ Amino-Gruppe darstellt und so gleichzeitig als Schutzgruppe dient. Sie kann bei Bedarf einfach durch Hydrierung mit Pd/C-Katalyse in die Amino-Funktion umgewandelt werden und steht dann direkt für die nächste Kupplung zur Verfügung<sup>[116,117]</sup>.

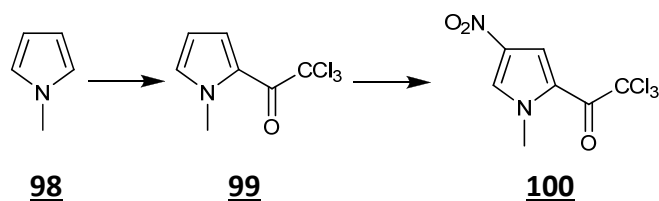
Die Präsenz einer Carbonsäurefunktion ermöglicht die Verwendung von Standard Kupplungsreagenzien wie DIC/HOBt oder HBTU etc. Der Einsatz dieser Reagenzien in Testreaktionen zeigte jedoch, dass der entstehende Harnstoff durch eine Säulenchromatographie allein nicht komplett abzutrennen ist. Man sieht zum Teil auch noch Signale von DIU und HOBt im NMR.

Aus der Beobachtung, dass die Reaktion der Trichloracetyl-Verbindung **100** mit O-Nucleophilen (wie z.B. OH<sup>-</sup>) z. B. Carbonsäuren liefert, entstand die Idee, die Reaktion mit primären N-Nucleophilen (H<sub>2</sub>NR) durchzuführen, um Amide zu erhalten:



**Abbildung 6-38:** Schema einer Haloform-Reaktion mit N-Nucleophilen zum Aufbau von Amiden.

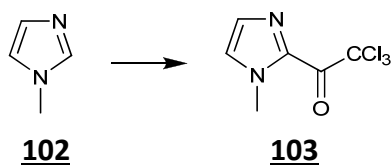
Testreaktionen mit β-Alaninmethylester zeigten, dass so sehr einfach Amid-Bindungen geknüpft werden können, wobei letztlich Chloroform als Nebenprodukt entsteht, welches einfach durch Evaporation entfernt werden kann. Das Trichloracetyl-Intermediat ist damit für diese Polyamid-Synthese mit einem Säurechlorid vergleichbar. Reaktionen dieser Art sind nach Durchsicht der Literatur auch schon in den Gruppen von J. W. Lown<sup>[118]</sup>, G. Yuan<sup>[111]</sup>, H. Sugiyama<sup>[119]</sup> und M. Shibuya<sup>[120]</sup> erfolgreich durchgeführt worden.



**Abbildung 6-39:** Zweistufige Synthese des Py-Monomers für die Flüssigphasensynthese. Hier wurde auf den Aufbau einer Carbonsäure-Funktion verzichtet.

Da nun der präparative Aufwand um eine weitere Stufe verkürzt und die Produkte leichter aufzureinigen waren, wurde ab diesem Zeitpunkt der Aufbau der Carbonsäurefunktion unnötig. Auf Kupplungsreagenzien konnte – außer in wenigen Fällen (siehe unten) – üblicherweise verzichtet werden. Durch diesen Ansatz gelang es auch, die benötigte Menge an Monomer auf 1.2 eq zu reduzieren.

Für das gewünschte Polyamid war noch ein Imidazol-Monomer notwendig, welches aber keine Amino-Funktion aufweisen musste. Aus diesem Grund reichte es aus, N-Methylimidazol **102** in 2-Position nach der Vorschrift von Y. Tor zu acylieren<sup>[115]</sup>.



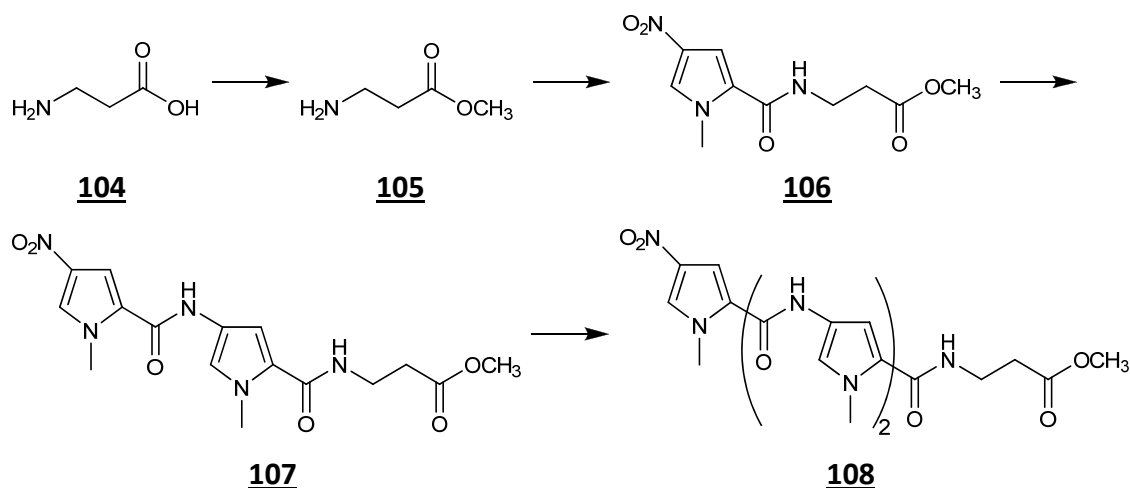
**Abbildung 6-40:** Zweistufige Synthese des Im-Monomers für die Flüssigphasensynthese.

Da nun alle notwendigen Voraussetzungen erfüllt waren, konnte die Synthese des Polyamids in flüssiger Phase durchgeführt werden.

### 6.2.1.1 Planung

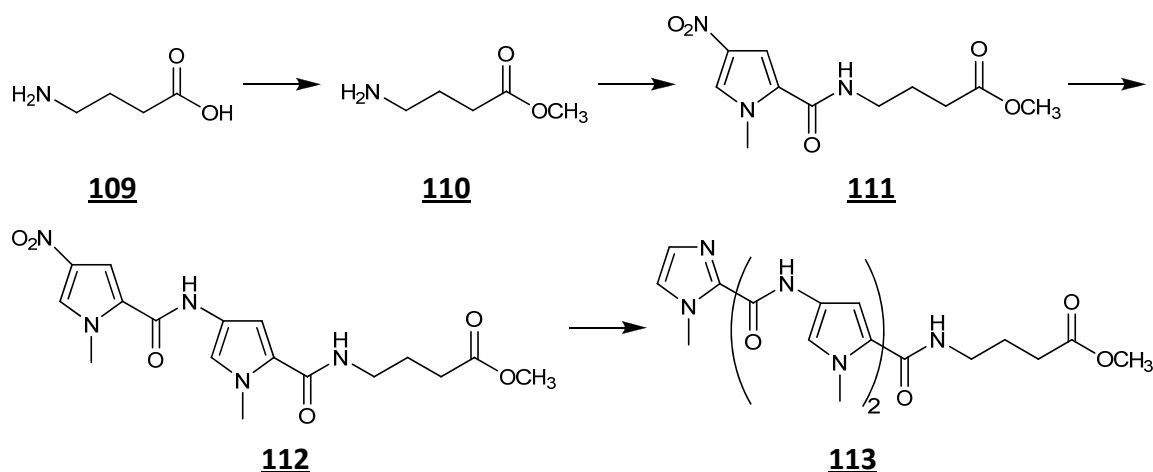
Zur Synthese des Hairpin-Polyamids wurde das Molekül retrosynthetisch in 2 geeignete Teile gesplittet und die einzelnen Fragmente getrennt dargestellt. Das Fragment **108** enthält hierbei  $\beta$ -Alaninmethylester **105** und 3 Pyrrol-Untereinheiten, während **113**  $\gamma$ -Aminobutan-säuremethylester **110**, 2 Pyrrol- und eine Imidazol-Untereinheit enthält.

$\beta$ -Alanin **104** soll zunächst mit  $\text{SOCl}_2$  in den Methylester **105** überführt und direkt danach mit **100** in die Pyrrol-haltige Zwischenstufe **106** umgesetzt werden. Zur erneuten Kupplung einer adäquaten Menge **100** zum Trimer **107** wird erst die Nitrofunktion von **106** mit Pd/C und  $\text{H}_2$  zum freie Amin reduziert. Die Reduktion der  $\text{NO}_2$ -Gruppe von **107** und anschließende Reaktion mit **100** führt dann zum Tetramer **108**.



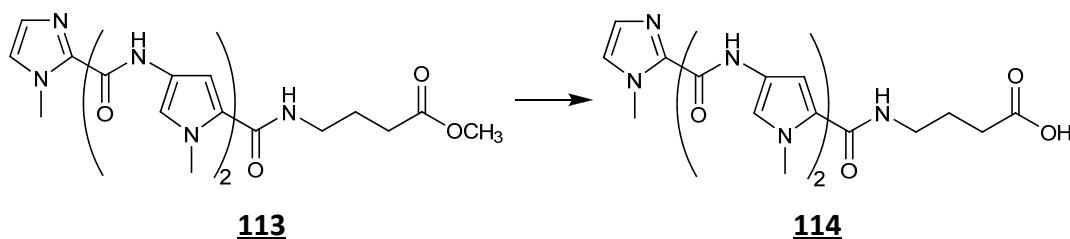
**Abbildung 6-41:** Geplanter synthetischer Ansatz zur Darstellung von **108**. Der Veresterung von β-Alanin folgen 3 repetitive Kupplungen mit dem Monomer **100**.

Der analoge Ansatz wird für **113** gewählt, wobei hier aber GABA **109** das Startmolekül ist, und als letzte Untereinheit das Imidazol-Derivat **103** verwendet wird.



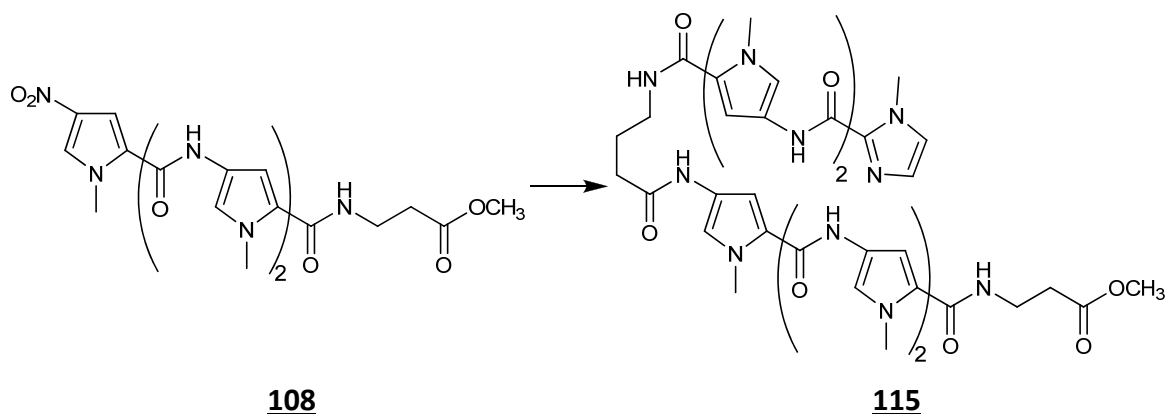
**Abbildung 6-42:** Synthese von **113**, ausgehend von γ-Aminobuttersäure. Nach der Darstellung des Esters wird selbiger 2x mit **100** und dann mit **103** umgesetzt.

Zur Kupplung der beiden Fragmente wird die Esterfunktion von **113** durch LiOH hydrolysiert (siehe **Abbildung 6-43**).



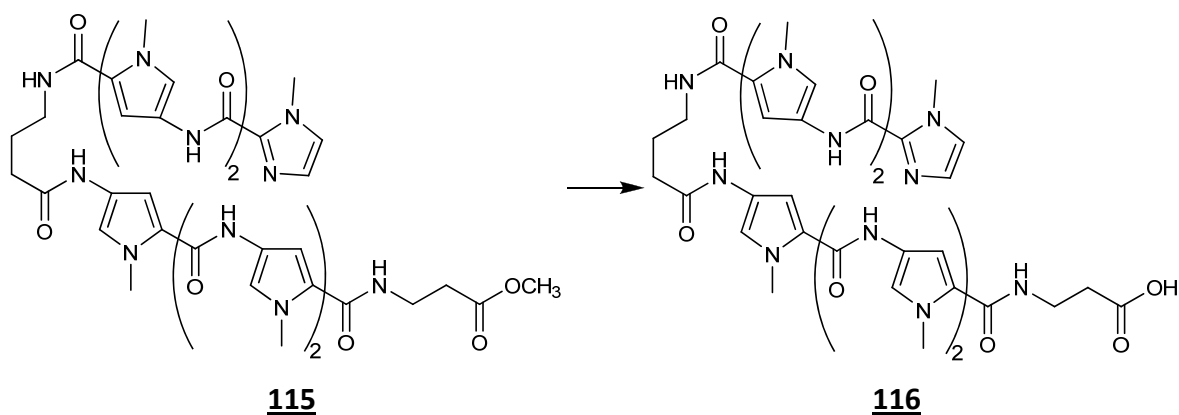
**Abbildung 6-43:** Hydrolyse der Ester-Funktion der GABA-Einheit mit LiOH unter milden Bedingungen.

Um das Polyamid **115** aufbauen zu können muss nun noch die Nitro-Gruppe von **108** reduziert werden, was wie bereits beschrieben durch  $\text{H}_2/\text{Pd}$  erreicht werden soll. Die Folgereaktion zum Polyamid wird mit Standard-Kupplungsreagenzien durchgeführt (siehe *Abbildung 6-44*).



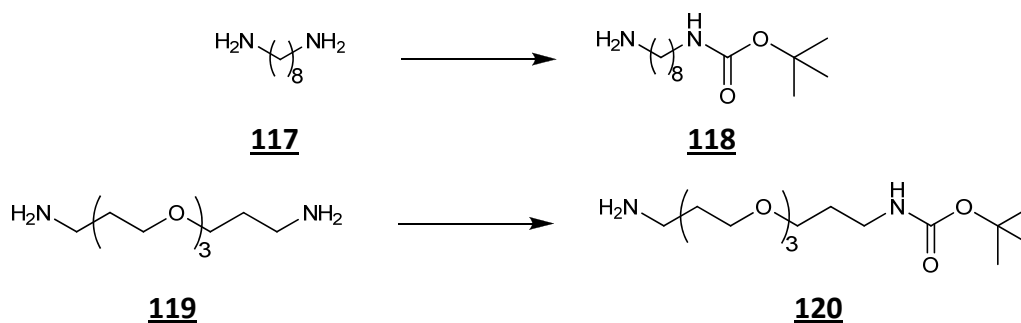
**Abbildung 6-44:** Kupplung der Fragmente **108** und **114** mit DIC/HOBt zum Polyamid-Oktamer **115**.

Um das Polyamid mit dem DNA-Spalter verbinden zu können, muss wieder die Ester-Funktion hydrolysiert werden, was unter Standardbedingungen möglich sein sollte.



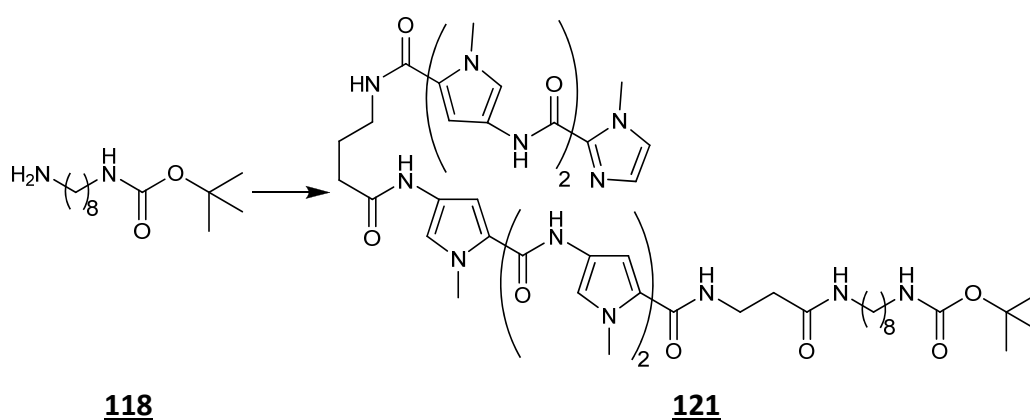
**Abbildung 6-45:** Basische Esterhydrolyse zur Freisetzung der Carbonsäurefunktion **116**. Wie schon zuvor wurde  $\text{LiOH}$  unter milden Bedingungen eingesetzt.

Um nach erfolgreicher Darstellung des Polyamids auch das DNA-Spaltreagenz kuppeln zu können, wird noch ein Linker benötigt. Hierzu werden  $\alpha$ - $\omega$ -Diaminoalkane variabler Kettenlänge wie 1,8-Diaminooctan **117** an einer Seite mit der säurelabilen Boc-Gruppe geschützt. Ein weniger unpolares Molekül stellt 1,13-Diamino-4,7,10-trioxotridecan **119** dar, welches auf die selbe Art Boc-geschützt wird.



**Abbildung 6-46:** Exemplarische Darstellung einiger Linker und deren Schützung mit Cbz-Cl oder Boc<sub>2</sub>O/Boc-ON.

Mit Standard-Chemie (DIC/HOBt) sollen das Polyamid und der Linker verbunden werden.



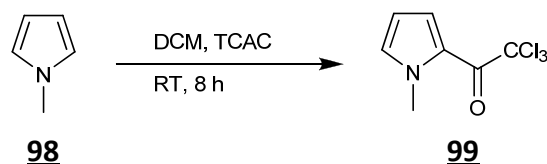
**Abbildung 6-47:** Kupplung vom geschützten Diamin **118** an das Polyamid **116**.

Bei Molekül **121** muss nur noch die Schutzgruppe entfernt werden, die in stark saurem Medium labil ist. Die folgende Reaktion besteht nun wieder in der Knüpfung einer Amid-Bindung mit **88** nach bewährtem Schema.

An dieser Stelle wird die Polyamid-Synthese mit 6.1.5 zusammengeführt, um letztlich nach Aufbau der Guanidin-Gruppen das DNA-spaltende Molekül zu erhalten.

#### 6.2.1.2 Durchführung

Als erstes Molekül wurde 2-Trichloracetyl-N-methylpyrrol **99** nach der bekannten Vorschrift von Peter B. Dervan dargestellt<sup>[113]</sup>. Die Reaktion lief problemlos ab und lieferte das Produkt in guten Ausbeuten im Multigramm-Maßstab.

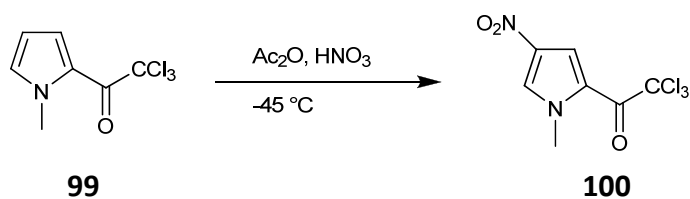


**Abbildung 6-48:** Unkatalysierte Friedel-Crafts-Acylierung von **98** mit Trichloressigsäurechlorid (TCEC).

Es hat sich gezeigt, dass die Reinheit des Produkts durch eine einfache Filtriersäule enorm gesteigert werden kann, da die Verunreinigung im wesentlichen aus einer Substanz besteht, die unter den verwendeten Bedingungen einfach auf der Säule zurückbleibt.

Ein noch reineres Produkt erhält man nach der Vorschrift von Y. Tor, in der mit DCM als Lösungsmittel gearbeitet wird. Dies ist auch schon in meiner Diplomarbeit durchgeführt worden. Neu ist hingegen die von Tor ausgearbeitete säulenchromatographische Aufreinigung, die relativ einfach ein EA-reines Produkt mit bis zu 75% Ausbeute liefert.

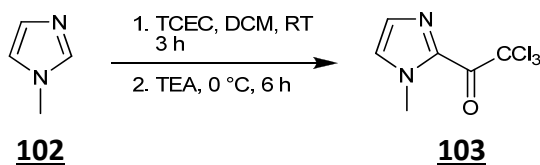
Die folgende von P. Dervan publizierte Nitrierung von **99** in 4-Position zu **100** war in der Literatur schon als der Schritt mit der geringsten Ausbeute angegeben<sup>[113]</sup>. Es gelang jedoch die Ausbeute zu steigern, indem die Reaktionslösung auf etwa ein Drittel des Volumens eingengt wird, bevor man das Produkt in der Kälte ausfällt.



**Abbildung 6-49:** Standard-Nitrierung von **99** mit intermediär gebildetem Acetylnitrat als Nitrierungsreagenz.

Durch einfaches Abfiltrieren und Nachwaschen mit <sup>i</sup>PrOH erhält man nach Trocknung ein fast weißes, EA-reines Produkt mit Ausbeuten bis zu 70%.

Die Darstellung von **103** wurde nach der Vorschrift von Y. Tor durchgeführt, welche sich nicht sehr stark von der publizierten Synthese von P. Dervan unterscheidet. Ein Unterschied ist jedoch wieder die Aufreinigung des Produkts, welche durch eine Säulenchromatographie erreicht wird.



**Abbildung 6-50:** Friedel-Crafts-Acylierung von **102** mit Trichloressigsäurechlorid.

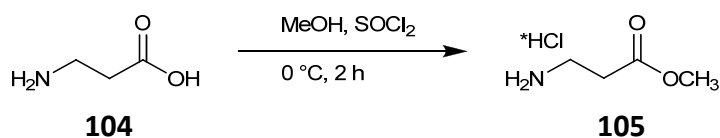


Die publizierten Chromatographie-Bedingungen sind allerdings nicht geeignet, die intensiv gelbe Verunreinigung vom annähernd farblosen Produkt abzutrennen, und wurden daher geändert, um ein elementaranalysenreines Produkt zu erhalten. Hier wurden Ausbeuten bis 72% erreicht.

Es bleibt anzumerken, dass sich **103** unter normalen Umgebungsbedingungen mit der Zeit verfärbt und zersetzt. Diese Zersetzung ist auch durch permanentes Lagern im Vakuum nicht zu verhindern. Aus diesem Grund sollte man die Substanz möglichst kühl und unter Argon aufbewahren.

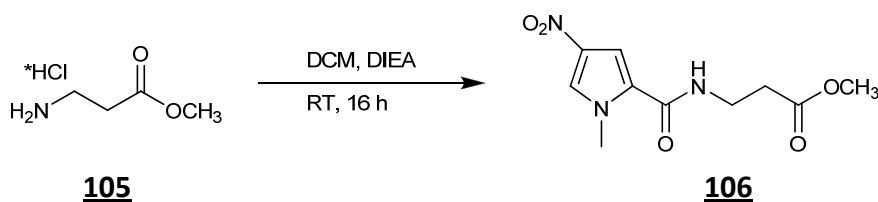
Die Moleküle **100** und **103** sind notwendige Voraussetzung für die Polyamid-Synthese. Um aber beginnen zu können ist noch die Veresterung von  $\beta$ -Alanin durchzuführen.

Die Darstellung von  $\beta$ -Alaninmethylester\*HCl **105** gelang nach einer Vorschrift von Moon *et al.* mit exzellenten Ausbeuten<sup>[121]</sup>. Man erhält durch bloßes Evaporieren des Lösungsmittels ein sehr reines Produkt, welches als solches direkt weiter eingesetzt werden kann.



**Abbildung 6-51:** Quantitative Veresterung von **104** mit Thionylchlorid in Methanol unter Eiskühlung.

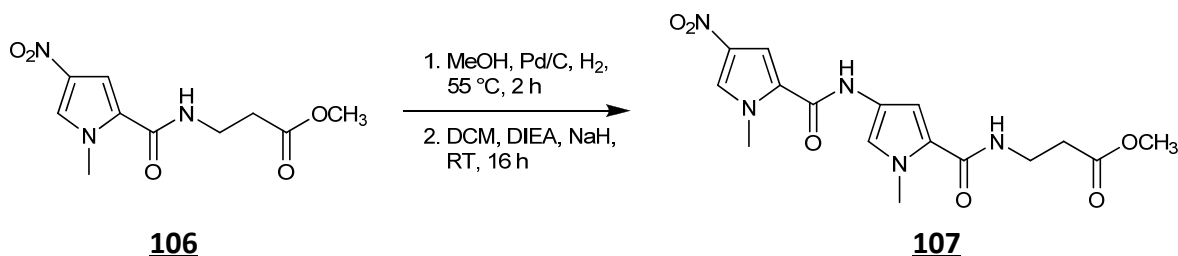
Für die erste Amid-Kupplung werden 1.1 eq der Nitroverbindung **100** eingesetzt und sonst nur noch DIEA hinzugefügt. Die Aufreinigung erweist sich als sehr einfach, denn eine Säulenchromatographie reicht aus, um **106** als reines Produkt zu erhalten.



**Abbildung 6-52:** Erste Amid-Kupplung von **105** und **100** zum Baustein **106**.

Um Verbindung **106** ein weiteres Mal mit 1.2 eq **100** kuppeln zu können, muss die Nitrofunktion erst in das freie Amin überführt werden. Dies geschieht unter Pd/C-Katalyse und H<sub>2</sub>-Druck. Das freie Amin wird immer frisch hergestellt und direkt umgesetzt, da sich auch in dieser Arbeit gezeigt hat, dass Aminopyrrole nicht stabil sind und sich binnen relativ kurzer Zeit zersetzen<sup>[111]</sup>. Diese Zersetzung kann schon an der Farbveränderung von farblos nach gelb während des Filtrierens über Celite beobachtet werden. Um diesen Zerfall zu vermeiden, wird die Suspension in einer Schlenkfritte unter Argon filtriert und schnellstmöglich bei etwa 40 °C unter Vakuum eingengt. So kann man den Zerfall deutlich verlangsamen.

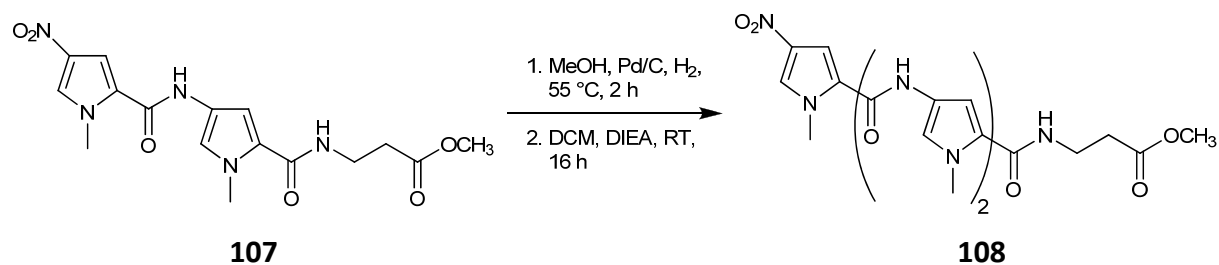
Das Produkt der zweiten Umsetzung (siehe *Abbildung 6-53*) fällt als gelber Feststoff aus und kann einfach abfiltriert werden. Nach Trocknung im Vakuum erhält man ein EA-reines Produkt.



**Abbildung 6-53:** Darstellung des Diamides **107** durch wiederholte Haloformreaktion mit **100**. Dieses Molekül fällt während der Reaktion aus und kann abfiltriert werden.

Hierbei soll jedoch angemerkt sein, dass die finale Ausbeute sehr stark schwanken kann, je nachdem, wie schnell die Filtration der Amin-Zwischenstufe über Celite gelingt. Eine kontinuierlich hohe Ausbeute lässt sich durch Verwendung von NaH und DIEA erreichen.

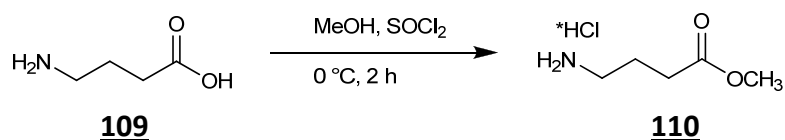
Für die Darstellung von **108** verfährt man genauso wie in der Reaktion zuvor. Die Nitroverbindung wird zunächst mit Pd/C und H<sub>2</sub> zum Amin reduziert und dann wieder mit **100** umgesetzt.



**Abbildung 6-54:** Dritte sequenzielle Monomer-Kupplung zur Darstellung des Triamides **108**.

Auch diese Reaktion bringt keinerlei Probleme mit sich; das Produkt **108** fällt aber nicht mit der Zeit aus der Lösung aus, sondern muss via Säulenchromatographie aufgereinigt werden. Dies steht im Gegensatz zu der Beobachtung von G. Yuan et.al.<sup>[111]</sup>, nach der Polyamide dieses Typs mit 2 oder mehr Heterozyklen unlöslich sind in den üblichen organischen Lösungsmitteln (mit teilweiser Ausnahme von DMF und DMSO).

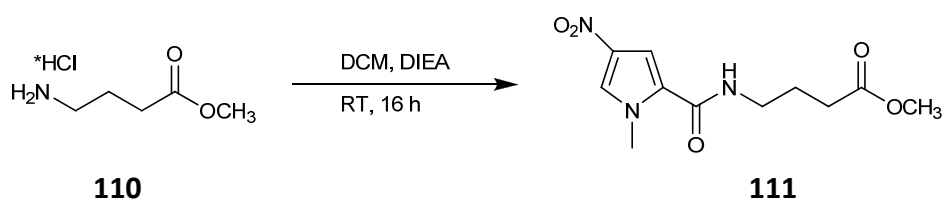
Für Fragment **113** ist der Methylester **110** aus  $\gamma$ -Aminobuttersäure **109** mit der analogen Reaktion zur Herstellung von  $\beta$ -Alaninmethylester dargestellt worden.



**Abbildung 6-55:** Erfolgreiche Veresterung der Aminosäure GABA **109** mit Thionylchlorid in eisgekühltem Methanol.

Auch diese Reaktion verläuft glatt und ist sehr einfach aufzureinigen. Man lässt die Reaktion für mindestens 2 h rühren, und erhält nach Aufarbeitung ein EA-reines Produkt mit bis zu 99 % Ausbeute.

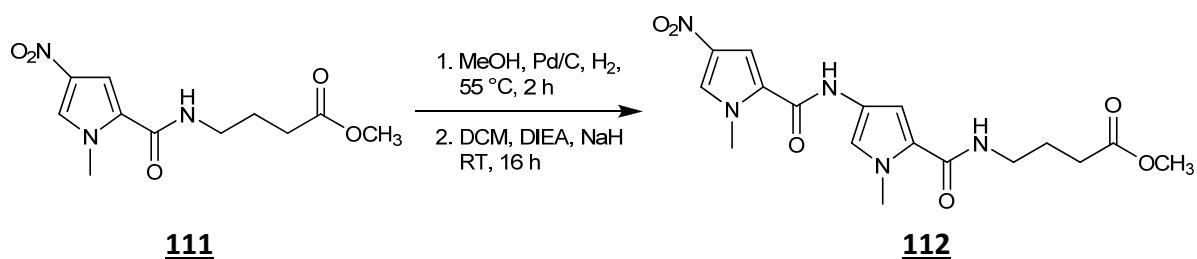
Die veresterte  $\gamma$ -Aminobuttersäure wird in der folgenden Reaktion einfach in DCM und Hünig-Base gelöst und mit Verbindung **100** versetzt, womit die erste Amid-Bindung von **113** aufgebaut wird.



**Abbildung 6-56:** Erste Umsetzung von GABA-Methylester mit dem Monomer **100**.

Die Reaktion verläuft problemlos bei RT und liefert **111** nach Aufreinigung via Säulenchromatographie in hohen Ausbeuten bis 98%.

Wie bei **106** muss auch hier jetzt die Nitro-Funktion reduziert werden, um den zweiten Heterozyklus anzuhängen. Dies geschieht auch wieder unter Pd/C-Katalyse und H<sub>2</sub>-Druck.

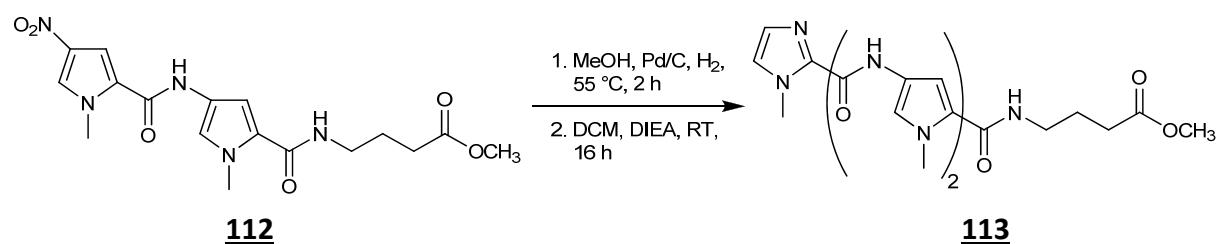


**Abbildung 6-57:** Erneute Umsetzung mit **100** unter Bildung des Diamides. **112** ist -wie **107** in der analogen Reaktion mit dem  $\beta$ -Alanin-Derivat- schlecht löslich und fällt während der Reaktion aus.

Wird nun das freie Amin in DCM mit 1.2 eq **100** umgesetzt, fällt nach einiger Zeit wieder ein gelber Feststoff aus, der sich nach Filtration als EA-reines Produkt **112** identifizieren lässt. Dies ist analog zur Beobachtung bei der Darstellung von **107**. Ebenso wie bei **107** lässt sich auch hier eine hohe Ausbeute (bis 73%) durch Verwendung von NaH als Base erreichen.

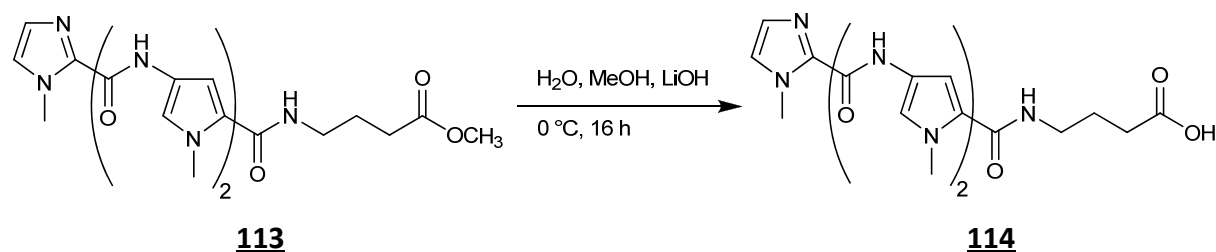
Um Molekül **113** darzustellen, wird **112** durch erneute Reduktion der Nitro-Gruppe für die letzte Haloform-Reaktion vorbereitet. Bei diesem letzten Schritt wird aber das Imidazol-Monomer **103** verwendet.

Auch diese Reaktion verläuft glatt und ohne Probleme. Das Produkt **113** kann durch eine einfache Säulenchromatographie sehr rein erhalten werden. Das gewünschte Produkt konnte dabei mit Ausbeuten bis 83% dargestellt werden.



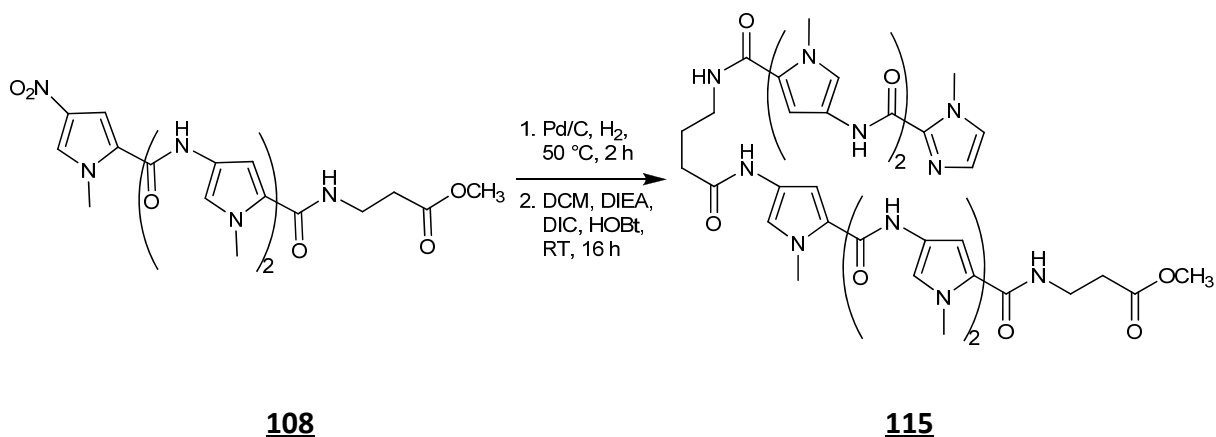
**Abbildung 6-58:** Letzte Amid-Formierung zur Fertigstellung einer Polyamid-Hälfte. Bei dieser Reaktion wird aber im Unterschied zu den anderen das Molekül **103** verwendet.

Die nun notwendige Esterhydrolyse von **113** wurde zunächst unter klassischen Bedingungen in refluxierender wässriger NaOH-Lösung durchgeführt, was aber zur Zerstörung des Polyamides geführt hat. Daher wurde nach einer milden Alternative gesucht, welche dann in einer Veröffentlichung von Corey<sup>[122]</sup> gefunden wurde.



**Abbildung 6-59:** Milde alkalische Esterhydrolyse von **113** mit LiOH in wässrigem Methanol bei 0 °C.

Das Edukt **113** löst sich nicht bzw. nur schlecht in wässrigem Methanol; es löst sich aber mit fortschreitender Reaktion/Zeit auf. So kann man sehr einfach den Reaktionsfortschritt am Verschwinden des Feststoffes beobachten und dann per DC auf Vollständigkeit prüfen. Es soll angemerkt sein, dass gelegentlich ein polareres Nebenprodukt bei dieser Reaktion entsteht, welches aber durch geeignete Chromatographie-Bedingungen abgetrennt werden kann. Üblicherweise verläuft die Reaktion mit bis zu 98% Ausbeute beinahe quantitativ.



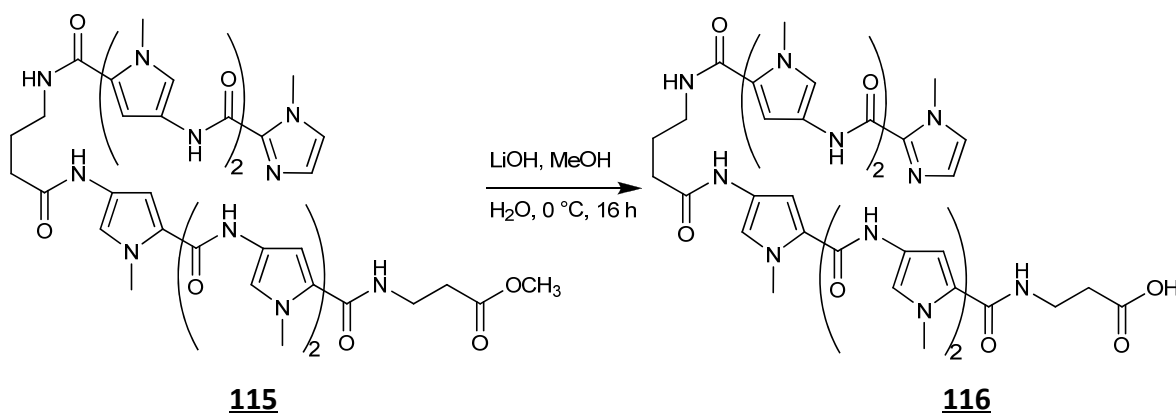
**Abbildung 6-60:** Kupplung der Fragmente **108** und **114** mit HOBt zum veresterten Polyamid **115**.

Um nun das Polyamid **115** aufzubauen wurde zunächst die Nitrofunktion von **108** wieder mit Pd-Katalyse reduziert und direkt im Anschluss mit **114** und klassischen Kupplungsreagenzien umgesetzt.

Im Gegensatz zu vorherigen Reaktionen wird hier das reduzierte Zwischenprodukt nicht mit DCM sondern mit DMF aufgenommen. Molekül **114** wird etwa 5 min mit DIEA, DIC und HOBt zur Reaktion gebracht, bevor man das reduzierte Zwischenprodukt hinzu gibt.

Die Aufreinigung von **115** gestaltet sich hier schwieriger, da das Produkt nach Säulenchromatographie noch nicht rein ist. In diesem Fall benötigt man noch eine semipräparative HPLC-Trennung. Das Produkt ließ sich nicht EA-rein erhalten, da noch eine geringe, unbekannte Menge TFA vorhanden war, die sich nicht komplett evaporieren ließ.

Die folgende Esterspaltung von **115** wurde wie zuvor bei **113** unter milden Bedingungen in einem alkalischen Methanol-Wasser-Gemisch durchgeführt.



**Abbildung 6-61:** Durchgeführte Esterhydrolyse von **115** mit LiOH bei milden Bedingungen.

Auch hier kann man den Reaktionsfortschritt am Verschwinden des Feststoffes sehen, und hat nach 16 h vollständigen Umsatz. Eine säulenchromatographische Aufreinigung liefert **116** als blass beigefarbenen Feststoff.

Das nun dargestellte Molekül **116** repräsentiert einen zentralen, sehr wichtigen Baustein dieser gesamten Dissertation. Es kann an der freien Carboxyl-Gruppe sehr variabel funktionalisiert und damit für verschiedenste DNA-Experimente vorbereitet werden.

Leider ergab sich in folgenden Reaktionen genau hier ein großes Problem: keines der verwendeten Amine ließ sich an die freie Carbonsäure-Funktion von **116** kuppeln. Weder durch die Kombination von DIC/HOBt als auch HBTU war die Kupplung zu erreichen. Die Massenspektren der Reaktionslösungen enthielten Hinweise auf die Bildung eines Azlactons. Eine anschließende Literatursuche bestätigte den Verdacht der Ringbildung, die schon durch alleinige Anwesenheit von Essigsäureanhydrid (oder auch DCC) abläuft<sup>[123,124,125]</sup>.

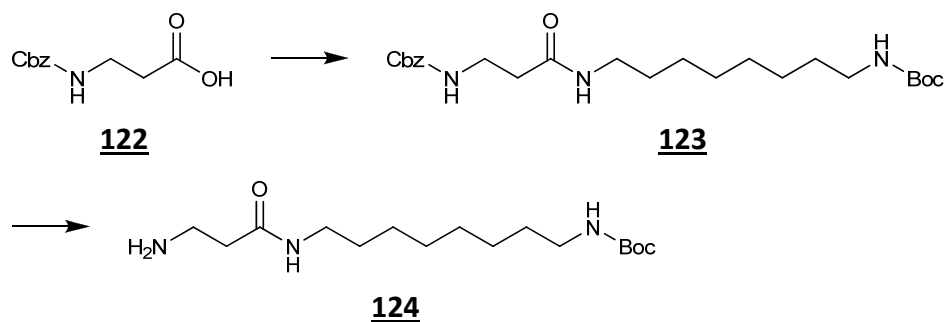
Da die Ringbildung sehr viel schneller abläuft als die Kupplung mit einem zweiten Molekül, musste die Synthese wiederum geändert werden.

## 6.2.2 Strategie 2

### 6.2.2.1 Planung

Die Idee war jetzt, das Polyamid (oder Teile davon) ohne den  $\beta$ -Alanin-Teil aufzubauen, und dann ein Fragment aus  $\beta$ -Ala und einem Linker zu kuppeln, um die in 6.2.1.2 genannten Kupplungsprobleme zu umgehen.

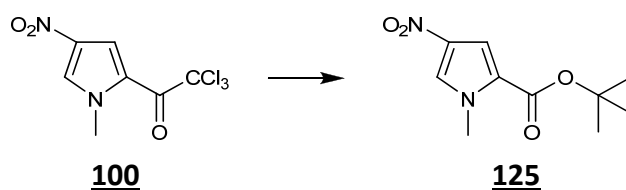
Der genannte Linker soll 2 Amino-Enden tragen und muss daher orthogonale Schutzgruppen aufweisen. Aus diesem Grund wird kommerziell verfügbares Cbz- $\beta$ -Alanin **122** unter Zuhilfenahme von Standardreagenzien wie z.B. T3P/DIEA mit einem Mono-Boc-geschützten Diamin wie **118** gekuppelt.



**Abbildung 6-62:** Darstellung des Linkers **124**, bestehend aus Diaminooktan und  $\beta$ -Alanin.

Die Cbz-Schutzgruppe kann dann mit  $H_2$  unter Druck entfernt werden, und man erhält **124**, welches an das Polyamid-Fragment gekuppelt werden kann.

Für die Synthese des Fragmentes, das später einmal das  $\beta$ -Ala enthalten soll muss ein anderer Startpunkt gewählt werden als bisher. Das Startmolekül soll eine Funktionalität tragen, aus der man später leicht eine Carbonsäure freisetzen kann. Dies soll durch die Verwendung eines  $tert$ -Butylesters erreicht werden. Damit muss aber auch **100** wiederum geeignet modifiziert werden, indem eine Haloform-Reaktion mit Natrium- $tert$ -butanolat durchgeführt wird:



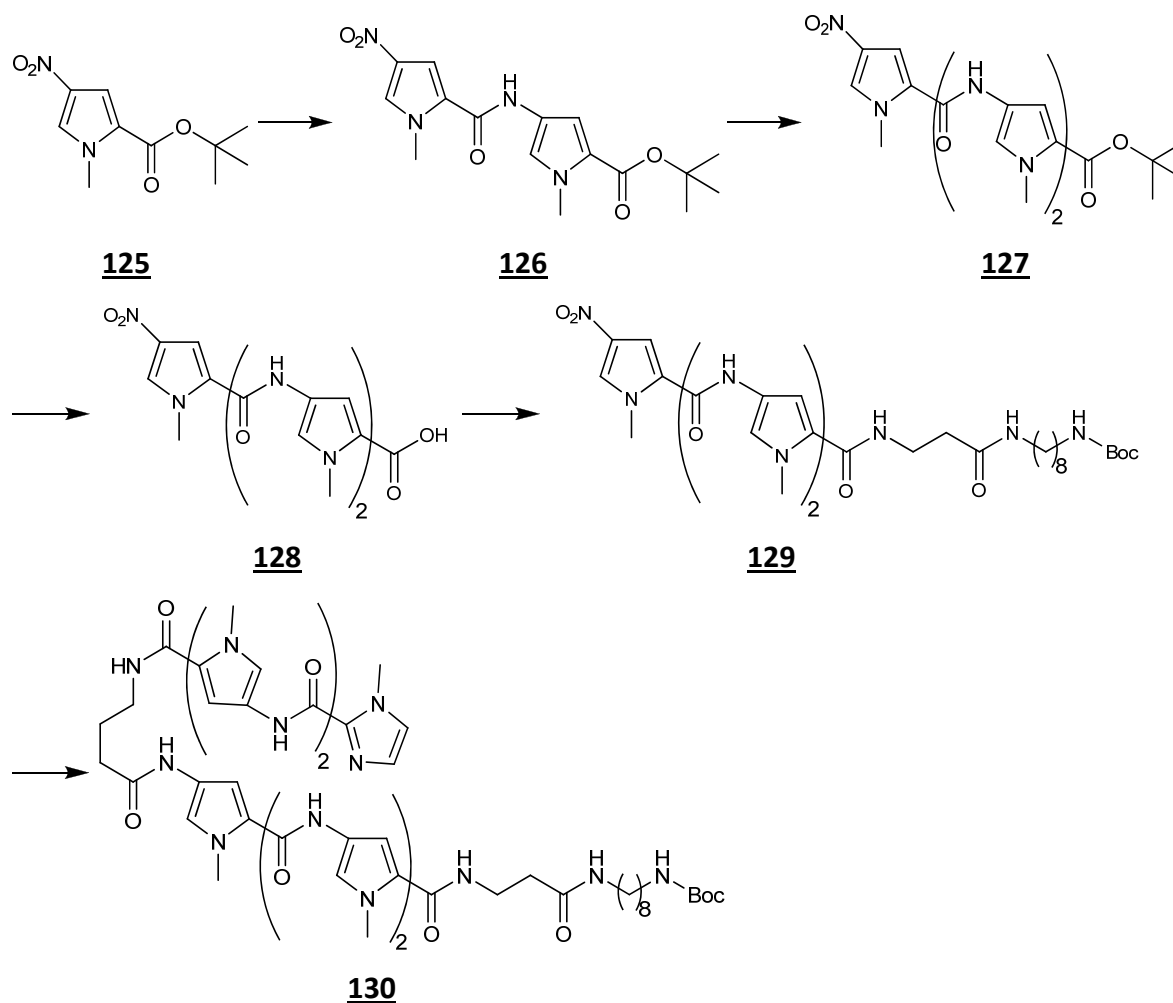
**Abbildung 6-63:** Darstellung des  $tert$ -Butylesters **125** durch eine Haloform-Reaktion.

Wie bereits zuvor soll durch wiederholte Reduktion der Nitrogruppe und Kupplung mit **100** das aus 3 Heterozyklen bestehende Fragment **127**<sup>[126]</sup> aufgebaut werden. Ein Intermediat ist dabei das Dimer **126**<sup>[126]</sup>.

Sobald die 3 Pyrrol-Ringe aneinandergehängt sind, soll der Ester mit  $TiCl_4$  gespalten werden, um die Carbonsäure **128**<sup>[127]</sup> freizusetzen und anschließend den Linker **124** zu koppeln. Auch diese Reaktion soll wieder mit T3P/DIEA durchgeführt werden.

Das Molekül **129** stellt nun eine Hälfte des Polyamids dar, welche sowohl  $\beta$ -Ala als auch einen Linker trägt.

Die Nitro-Funktion wird nun wieder *in situ* reduziert und kann mit Molekül **114** zum kompletten Polyamid **130** umgesetzt werden. Die Übersicht dieser Synthese-Route ist in *Abbildung 6-64* dargestellt:



**Abbildung 6-64:** Geplanter synthetischer Ansatz zur Darstellung von Polyamid **130**.

Sobald die säurelabile Schutzgruppe entfernt ist, sollten beliebige weitere Moleküle mit geeigneten funktionellen Gruppen (wie z.B. DABCYL) kovalent anzuhängen sein.

### 6.2.2.2 Durchführung

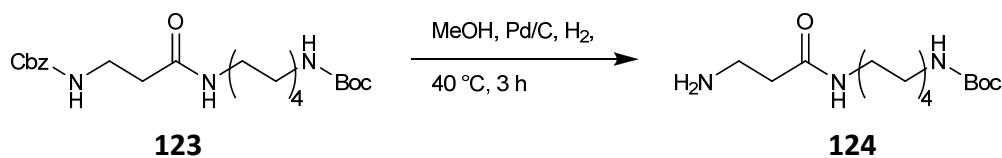
Die Reaktion von Cbz- $\beta$ -Alanin mit **118** verlief wie erwartet glatt mit T3P als Kupplungsreagenz. Eine zweistufige Säulenchromatographie liefert das gewünschte Produkt **123** in guten Ausbeuten.



**Abbildung 6-65:** T3P-vermittelte Kupplung von Cbz-geschütztem  $\beta$ -Alanin an **118**.

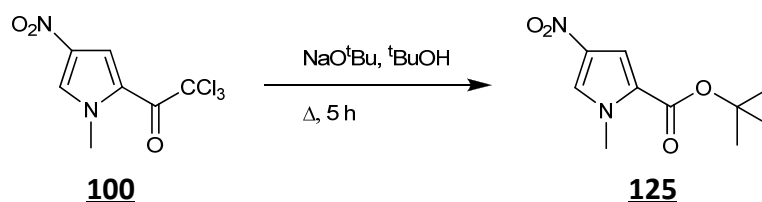


Die Entfernung der Cbz-Schutzgruppe von Molekül **123** wird dann mit  $H_2$  unter Pd-Katalyse problemlos durchgeführt. Das Produkt ist nach Filtration über Celite schon rein genug, um es weiter umzusetzen. Eine korrekte Elementaranalyse für **124** konnte jedoch auch nach Säulenchromatographie nicht erhalten werden.



**Abbildung 6-66:** Palladium-katalysierte Entfernung der Cbz-Schutzgruppe zur Darstellung von **124**.

Der Linker **124** ist jetzt bereit zur Kupplung an das entsprechende Polyamid-Fragment. Die Synthese dieses Fragments geht aus von **100**, das in einer Additions-Eliminierungs-Reaktion glatt mit bis zu 91% Ausbeute zu **125** reagiert.

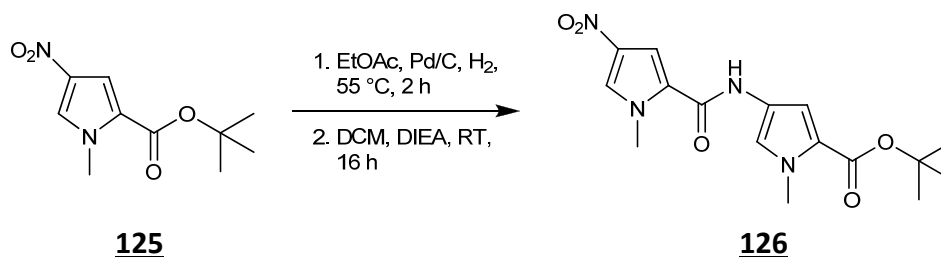


**Abbildung 6-67:** Haloform-Reaktion zur Darstellung von **125** mit  $\text{NaO}^t\text{Bu}$  als Nucleophil

Das Produkt ist nach Quenching mit Wasser durch Extraktion mit DCM einfach zu isolieren, und liegt dazu nach Trocknung in elementaranalysenreiner Qualität vor.

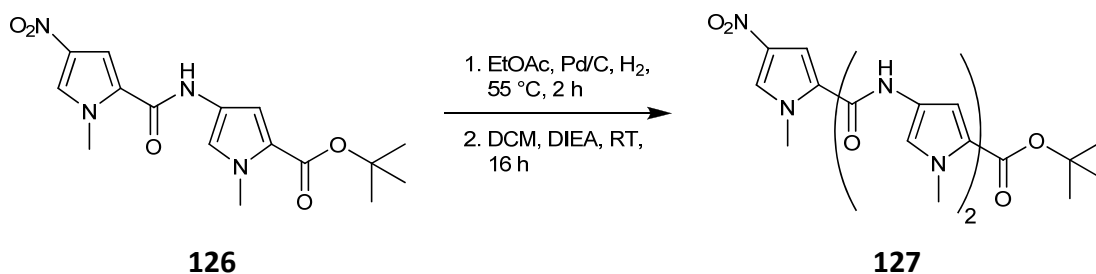
Die Reduktion der Nitro-Gruppe von **125** funktioniert ebenso wie bei den oben beschriebenen analogen Reaktionen innerhalb von wenigen Stunden quantitativ. Das Produkt muss aber auch direkt mit dem Monomer **100** umgesetzt werden, weil es sich innerhalb kurzer Zeit zersetzt.

Die Aufreinigung ist in diesem Fall sehr einfach, da eine einzelne Filtration ausreicht, um das während der Reaktion ausgefallene Produkt elementaranalysenrein zu erhalten. Die erhaltenen Ausbeuten betrugen bis zu 74%.



**Abbildung 6-68:** Formierung des Diamides **126** durch Umsetzung mit dem Py-Monomer **100**.

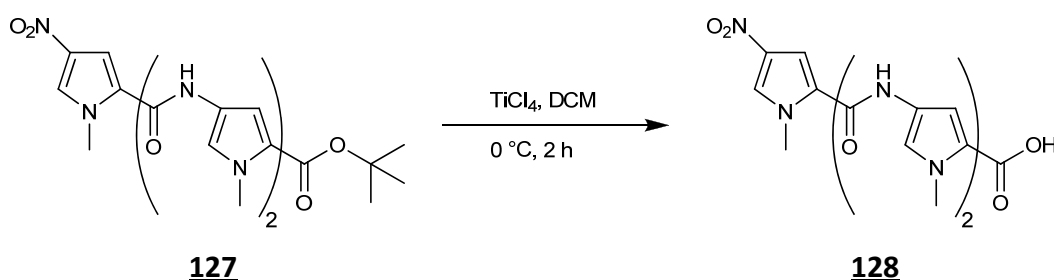
Der nächsten Reaktion mit **100** geht wieder eine NO<sub>2</sub>-Reduktion voraus, die ebenso glatt verläuft, wie im Schritt zuvor. Der Unterschied liegt hier bei der anschließenden Aufreinigung aber in der Notwendigkeit einer Säulenchromatographie, denn das Produkt **127** fällt bei dieser Reaktion nicht aus. Das gewünschte Molekül konnte mit Ausbeuten von bis zu 79% dargestellt werden.



**Abbildung 6-69:** Weitere Amid-Kupplung mit dem Monomer **100**. Das Produkt fällt in diesem Fall nicht aus der Lösung aus, sondern muss per Chromatographie aufgereinigt werden.

Bisweilen kann es vorkommen, dass das Reduktions-Produkt, das zwischenzeitlich aus der Nitro-Gruppe von **126** freigesetzt wird, als weißer Feststoff ausfällt. Wenn dies der Fall ist, erweist sich das freie Amin als recht schwerlöslich, und kann nicht mit DCM aufgenommen werden. Ein geeignetes Lösungsmittel ist in diesem Fall DMF.

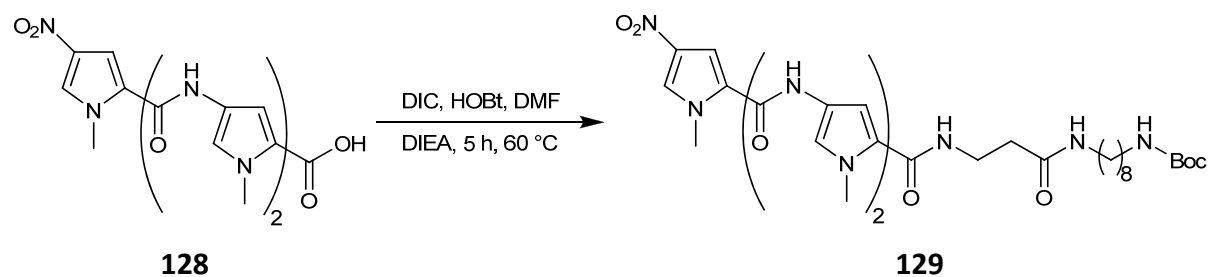
Die Esterspaltung mit TiCl<sub>4</sub> verläuft ebenfalls gut und unproblematisch in DCM nach dem Schema:



**Abbildung 6-70:** Spaltung des <sup>t</sup>Butyl-Esters von **126**, hier jedoch nicht mit LiOH, sondern mit TiCl<sub>4</sub> in wasserfreiem DCM.

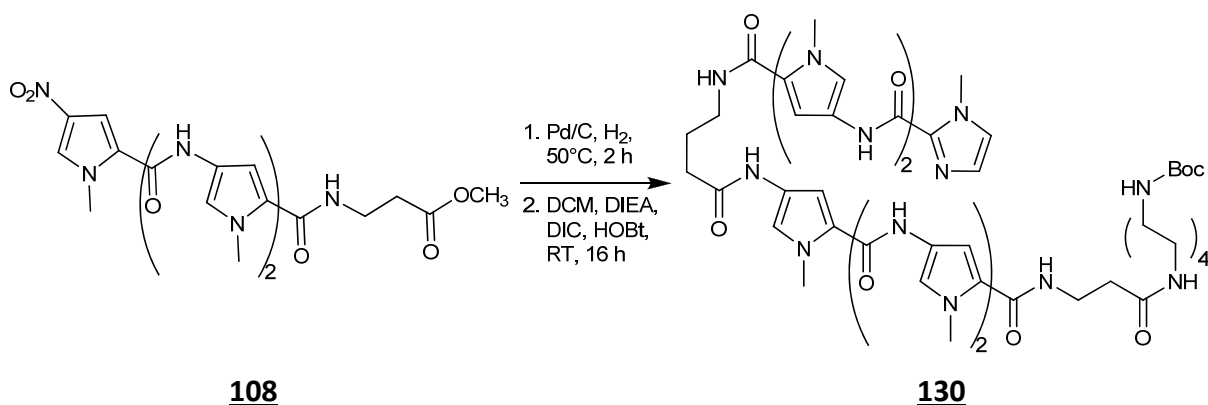
Das Produkt kann einfach durch Ansäuern mit HCl ausgefällt und abfiltriert werden, jedoch erhält man hierbei kein elementaranalysenreines Produkt **128**.

Eine Säulenchromatographie der schlecht löslichen Carbonsäure **128** brachte auch nicht den notwendigen Reinigungseffekt für die Mikroanalyse. Die Reinheit ist jedoch auch nach einer einfachen Filtration ausreichend, um die Säure **128** in der folgenden Reaktion einzusetzen.



**Abbildung 6-71:** Kupplung vom Linker **124** und der Triamid-Carbonsäure **128** zu **129**, mit dem die erste Hälfte des Dervan-Polyamids fertig gestellt ist.

Auch diese Reaktion ließ sich mit Standard-Reagenzien leicht in guten Ausbeuten realisieren. Jedoch konnte auch hierbei keine korrekte Elementaranalyse für **129** erhalten werden. Die weitere Umsetzung zu **130** funktionierte nach bekanntem Schema mit Reduktion der Nitro-Gruppe und anschließender Kupplung mit der freien Carbonsäure **108**.



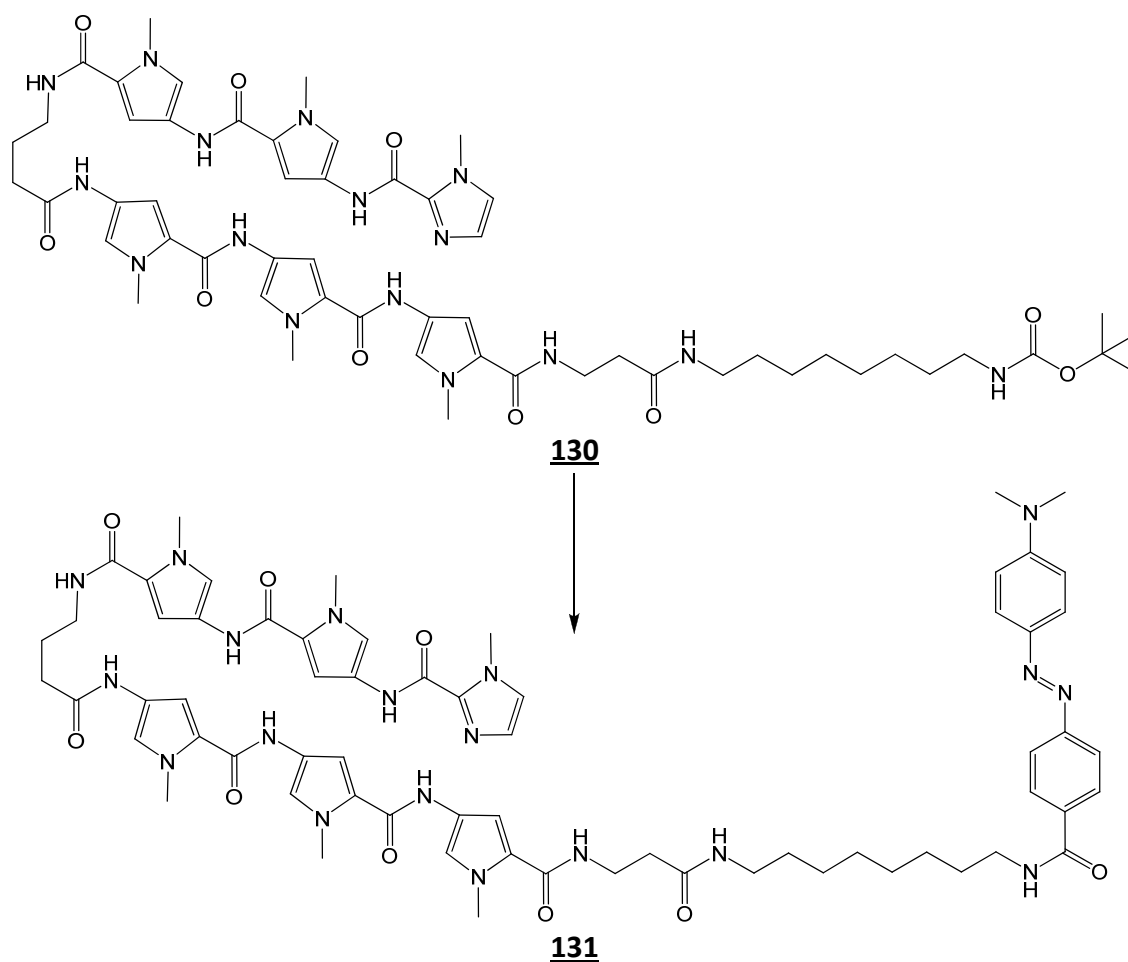
**Abbildung 6-72:** Kupplung der Fragmente **108** und **129** zum fertigen Polyamid **130**. Diese Reaktion wurde wieder mit den Standard-Reagenzien DIC und HOBT durchgeführt.

Eine Säulenchromatographie war notwendig, um Kupplungsreagenzien und Nebenprodukte abzutrennen und **130** als elementaranalysenreinen Feststoff zu erhalten.

Dieses Polyamid sollte nun Ausgangspunkt für diverse Derivate sein. Als erstes sollte das Molekül mit DABCYL<sup>[V]</sup> markiert werden, um mit **131** im Anschluss eine Fluoreszenz-Titration durchzuführen.

Die Entfernung der Schutzgruppe gelang recht einfach mit wasserfreier, methanolischer HCl, und die folgende Kupplung konnte ebenso recht leicht durchgeführt werden.

<sup>V</sup> DABCYL wurde mir freundlicherweise von Herrn Dipl.-Chem. Sven T. Breitung zur Verfügung gestellt



**Abbildung 6-73:** Kupplung vom roten Azofarbstoff DABCYL an das Polyamid **130**, bei dem direkt vorher die Boc-Schutzgruppe mit Säure entfernt wurde.

Zu beachten war hier, dass die berechnete Menge von DIEA (3 eq) nicht ausreichte, um die DMF-Lösung anzubasieren. Dies konnte sehr leicht an der Färbung vom DMF (durch DABCYL) beobachtet werden, denn der Farbstoff ändert pH-abhängig seine Farbe. Aus diesem Grund wurde zur Neutralisation des Polyamids (nach Entschützung als multiples HCl-Salz vorliegend) zunächst solange DIEA hinzuge tropft, bis sich die Farbe umschlug. Erst danach wurde die berechnete Menge DIEA hinzugefügt.

Die Aufreinigung gelang recht einfach, nachdem die Löslichkeitsprobleme durch Zufügen von MeOH erst einmal überwunden waren. Eine gute Reinheit wurde durch Chromatographie erreicht, wenn auch dabei keine korrekte Elementaranalyse erhalten werden konnte.

Bei ersten Experimenten mit dem Polyamid-Derivat **131** stellte sich aber heraus, dass das Molekül entgegen allen Erwartungen nicht an DNA bindet. Diese Beobachtung wurde noch mit massenspektrometrischen Untersuchungen überprüft und bestätigt.

Die Ursache wurde in der Abwesenheit einer protonierbaren Stelle vermutet, was dazu führt, dass die elektrostatische Attraktion zwischen DNA-Rückgrat und Polyamid fehlt. Dazu kam eine recht schlechte Löslichkeit in Wasser.

Um diese Theorie auf ihre Richtigkeit zu untersuchen, soll in den Linker ein protonierbares Amin eingebaut werden.

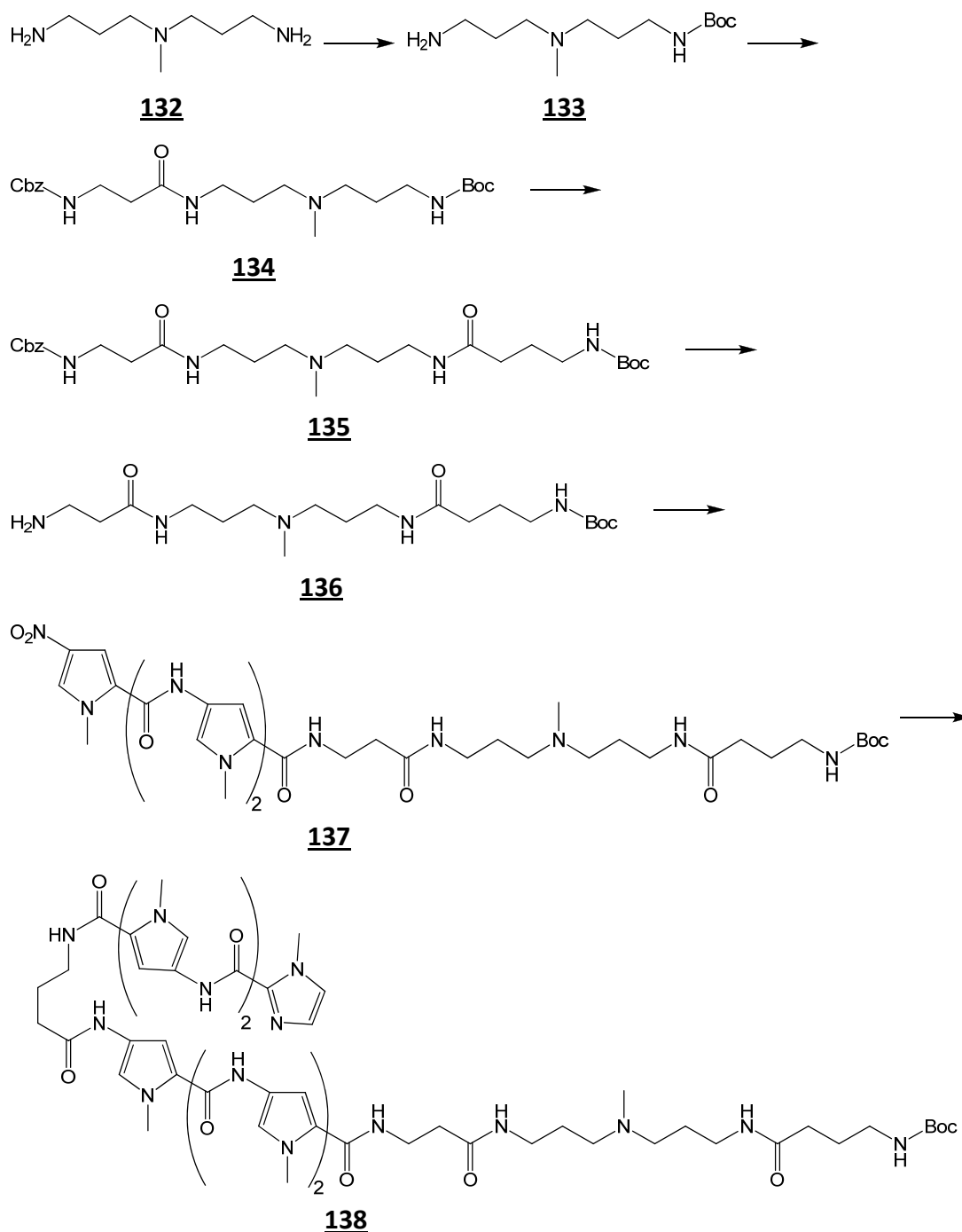
### 6.2.3 Strategie 3

#### 6.2.3.1 Planung

Diese neue Synthese orientiert sich an der beschriebenen aus Kapitel 6.2.2.1 und ist in der Übersicht in *Abbildung 6-74* dargestellt. Hier wird das 1,8-Diaminooktan **117** ersetzt gegen das Diamin **132**, welches die geforderte Eigenschaft eines protonierbaren Stickstoffes aufweist.

Von den beiden Aminogruppen soll zunächst selektiv eine geschützt werden, damit dann auf **133** kommerziell erhältliches Cbz-geschütztes  $\beta$ -Alanin gekuppelt werden kann. Die Schutzgruppe von **134** wird dann mit methanolischer, wasserfreier HCl entfernt, und die freie Aminogruppe mit ebenfalls kommerziell erhältlicher Boc-geschützter  $\gamma$ -Aminobuttersäure umgesetzt. Die Cbz-Schutzgruppe von **135** wird dann hydrogenolytisch unter Pd-Katalyse abgespalten, und mit Standard-Kupplungschemie wie DIC/HOBt mit **128** verbunden. Die Nitrogruppe wird unter Pd-Katalyse mit  $H_2$  reduziert und kann im Anschluss mit **114** zur Reaktion gebracht werden, womit das Polyamid **138** fertig gestellt wäre.

Dieses Molekül ist analog zu den vorherigen Überlegungen wieder der Startpunkt für zahlreiche mögliche Derivatisierungen, aber auch gleichzeitig Teil des Zielmoleküls **46**, und muss nur noch mit **88** kondensiert werden.

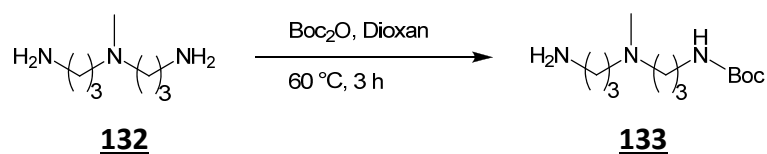


**Abbildung 6-74:** Übersicht über die neuerlich veränderte Synthese zur Darstellung des Polyamides **138**. Dieses Molekül weist nun einen protonierbaren Stickstoff im Linker auf, und sollte so wieder an DNA binden können.

### 6.2.3.2 Durchführung

Die Einführung von nur einer Schutzgruppe in **132** funktionierte problemlos nach einer Vorschrift von Krapcho<sup>[128]</sup>.

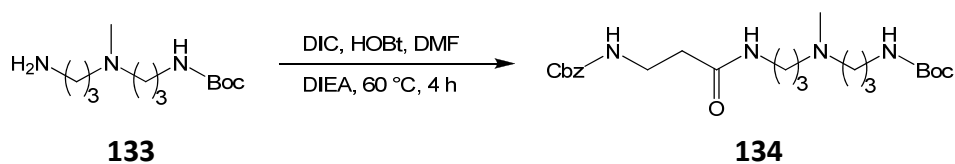
Auch hier war es notwendig, das Diamin im Überschuss einzusetzen, um eine doppelte Schützung zu vermeiden.



**Abbildung 6-75:** Äquivalentgesteuerte Einfach-Schätzung des Amins **132** mit  $\text{Boc}_2\text{O}$ . Nur durch einen großen Überschuss des Amins ließ sich eine Zweifachschätzung vermeiden.

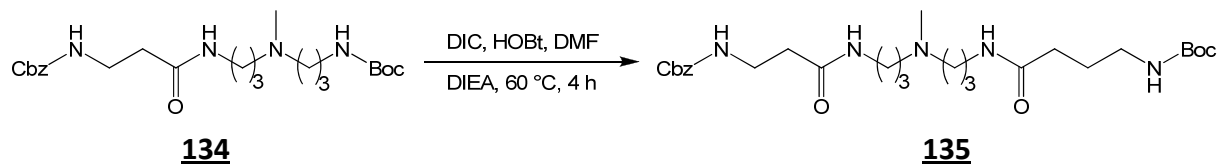
Eine Vakuumdestillation erwies sich als vorteilhaft (gegenüber der Chromatographie) bei der Aufreinigung von **133**, was sowohl die aufgewendete Zeit als auch die Reinheit angeht.

Die anschließende Kupplung von **133** mit Cbz- $\beta$ -Alanin hat auch problemlos funktioniert, wobei sich hier ein recht angenehmer Weg zur Entfernung des entstehenden DIU ergeben hat: das Harnstoffderivat fällt beim Aufkonzentrieren der Extraktionsphase aus und kann einfach abfiltriert werden. Die verbleibenden Reste des Harnstoffes werden dann während der Chromatographie abgetrennt.



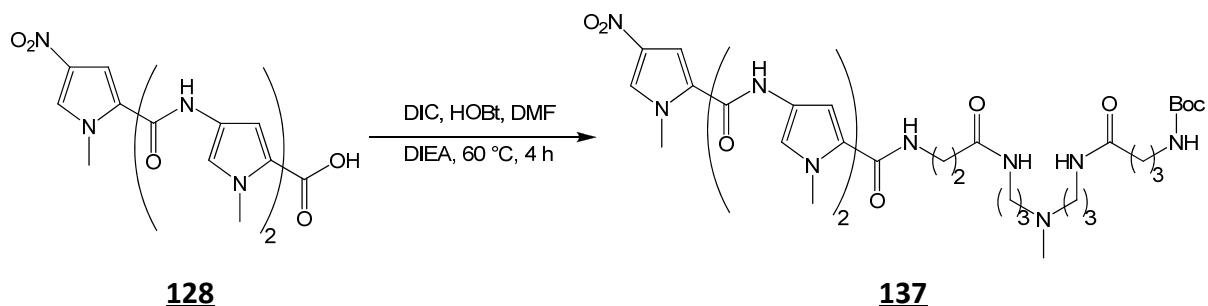
**Abbildung 6-76:** Reaktion von kommerziell verfügbarem Cbz- $\beta$ -Alanin unter Standard-Bedingungen an das einfach geschützte Amin **133**.

Die nun folgende Reaktion zu **135** ließ sich ebenso einfach durchführen wie schon die Reaktion zu **134**; hier muss aber zunächst eine Boc-Gruppe entfernt werden, was mit methanolischer, wasserfreier HCl erreicht werden konnte. Der Harnstoff war ebenso einfach zu entfernen wie in der Reaktion zuvor, und die Säulenchromatographie lieferte ein sehr reines Produkt.



**Abbildung 6-77:** Zweistufige Umsetzung vom orthogonal geschützten Diamin **134** mit Boc-geschütztem GABA. Zunächst wurde die Boc-Schutzgruppe unter sauren Bedingungen entfernt, und dann das Zwischenprodukt mit Standard-Reagenzien zur Reaktion gebracht.

Für die nächste Kupplung musste zunächst die Cbz-Schutzgruppe entfernt werden, was quantitativ in 3 h zu erreichen ist. Das freie Amin, welches hierbei entsteht, wurde aber nicht weiter aufgereinigt bzw. charakterisiert, sondern direkt weiter mit **128** umgesetzt.



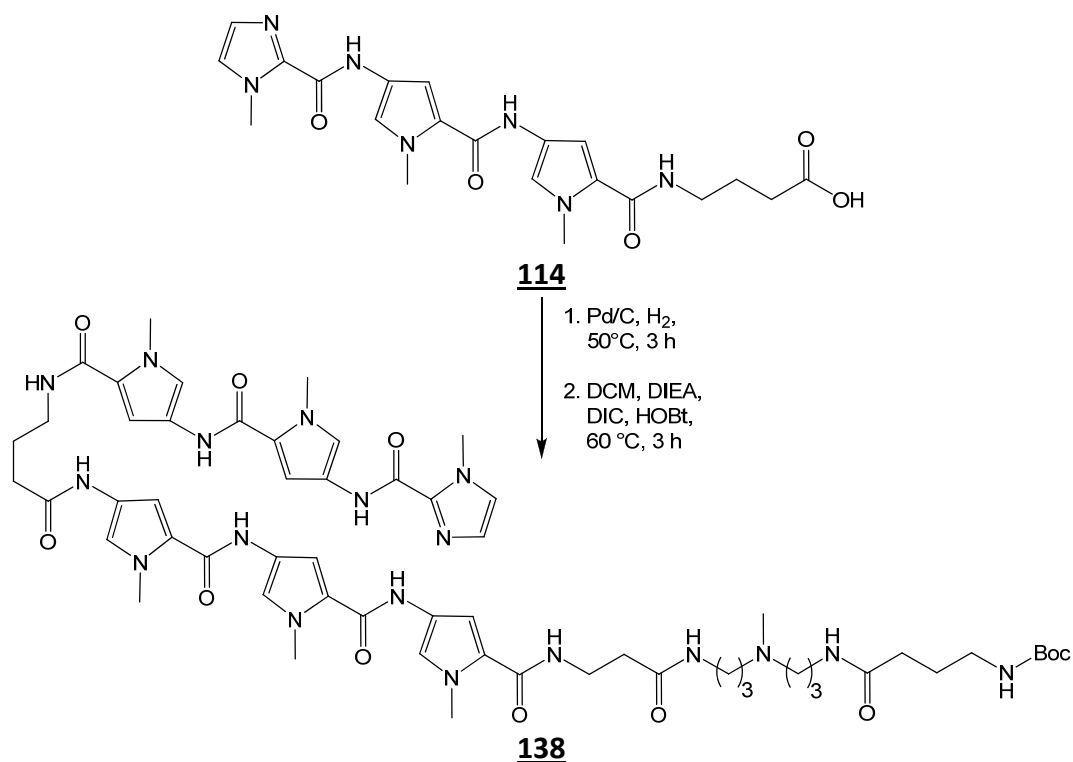
**Abbildung 6-78:** Erfolgreiche Kupplung des Linkers **135** an das Heterozyklen-Fragment **128**. Die Boc-Schutzgruppe von **135** ist zuvor wieder mit wasserfreier, methanolischer HCl entfernt worden.

Auch diese Reaktion verläuft unkompliziert, liefert allerdings nach Aufreinigung **137** als Schaum, wobei das Lösungsmittel und  $\text{NEt}_3$  nicht komplett entfernt werden konnten. Aus diesem Grund musste das Produkt erneut gesäut werden, wobei diesmal  $\text{NEt}_3$  durch  $\text{NH}_3$  ersetzt wurde.

Die Reaktion zum vollständigen Polyamid erforderte zunächst wieder die katalytische Hydrogenierung einer Nitro-Gruppe mittels Übergangsmetallkatalyse, wobei es diesmal ratsam ist, MeOH als Lösungsmittel zu verwenden, denn EtOAc kann das entstehende Amin nur schlecht lösen. Aber auch in MeOH kam es vor, dass das freie Amin aus der Lösung ausfiel. In diesem Fall musste das Zwischenprodukt vor der Filtration mit MeOH in Lösung gebracht werden, da andernfalls ein großer Ausbeuteverlust folgt. Nach der Filtration und nach der Evaporation des Lösungsmittels fiel das Amin gelegentlich als Feststoff aus, und ließ sich nicht wieder mit DCM aufnehmen. In diesem Fall musste etwas DMF hinzugefügt werden.

Die anschließende Umsetzung mit der Carbonsäure **114** verläuft wie die bisherigen Reaktionen aber wieder recht gut mit Standard-Kupplungschemie.



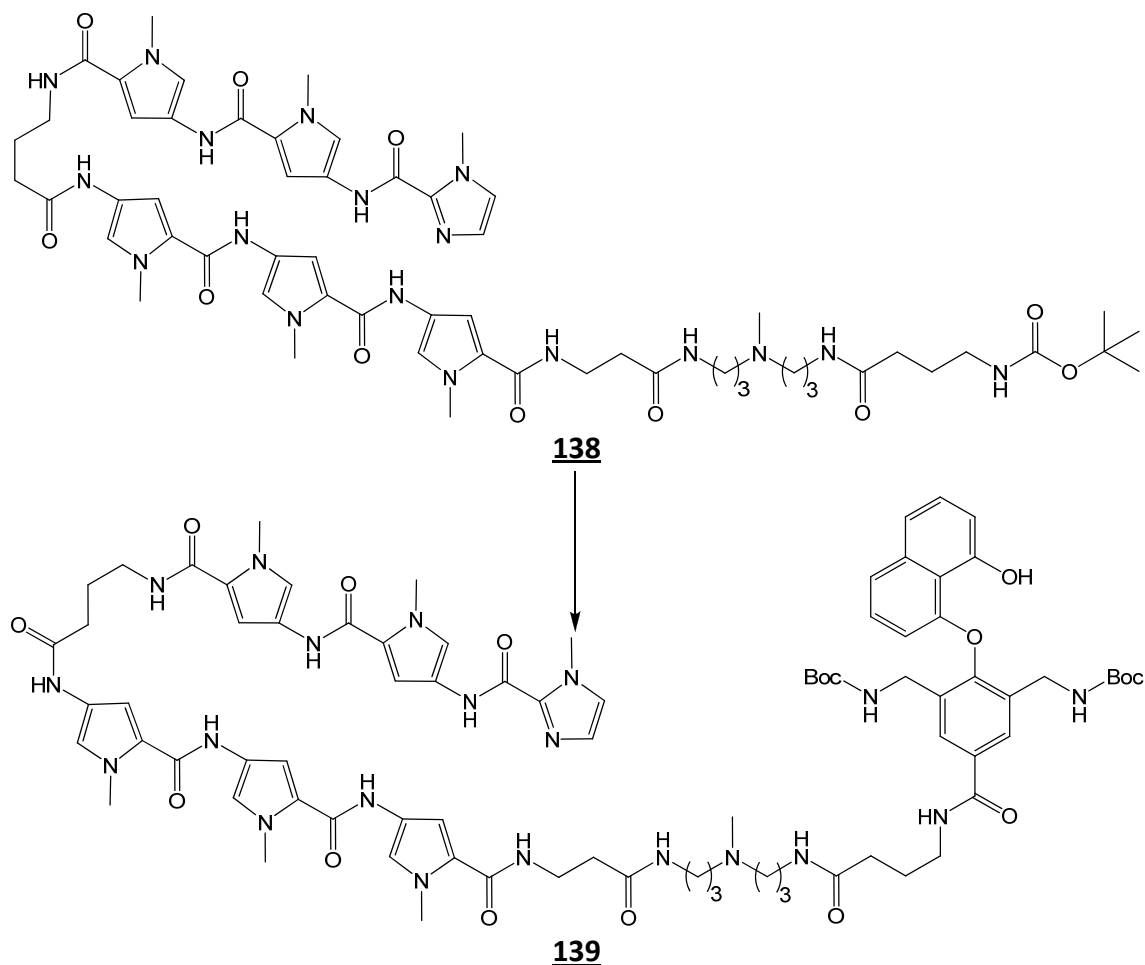


**Abbildung 6-79:** Vervollständigung des Polyamides **138** durch DIC/HOBT-vermittelte Zusammenfügung der beiden Heterozyklen-Fragmente.

Es ergibt sich bei der Aufreinigung allerdings das Problem, dass man bei der Chromatographie  $\text{NEt}_3$  zum Laufmittel geben muss, um geeignete Bedingungen zu erhalten. Man kann es nicht ohne weiteres gegen  $\text{NH}_3$  austauschen, da dies die Trennbedingungen zu stark beeinflusst und man kein reines Produkt erhält. Allerdings ist der Nachteil hierbei, dass man allein durch Evaporation das  $\text{NEt}_3$  nicht komplett vom Produkt **138** entfernen kann. Aus diesem Grund muss man das Produkt noch ein zweites Mal säulen, und dabei im Laufmittel das  $\text{NEt}_3$  gegen  $\text{NH}_3$  austauschen.

Für die folgende Amid-Kupplung ist vorangehend die Entfernung der Boc-Schutzgruppe von **138** notwendig, was auch quantitativ mit methanolischer  $\text{HCl}$  gelang. Die Umsetzung mit der aromatischen Carbonsäure **88** unter Standard-Kupplungsbedingungen (DIC/HOBT/DIEA in DMF) funktionierte dann auch wie erwartet innerhalb weniger Stunden.

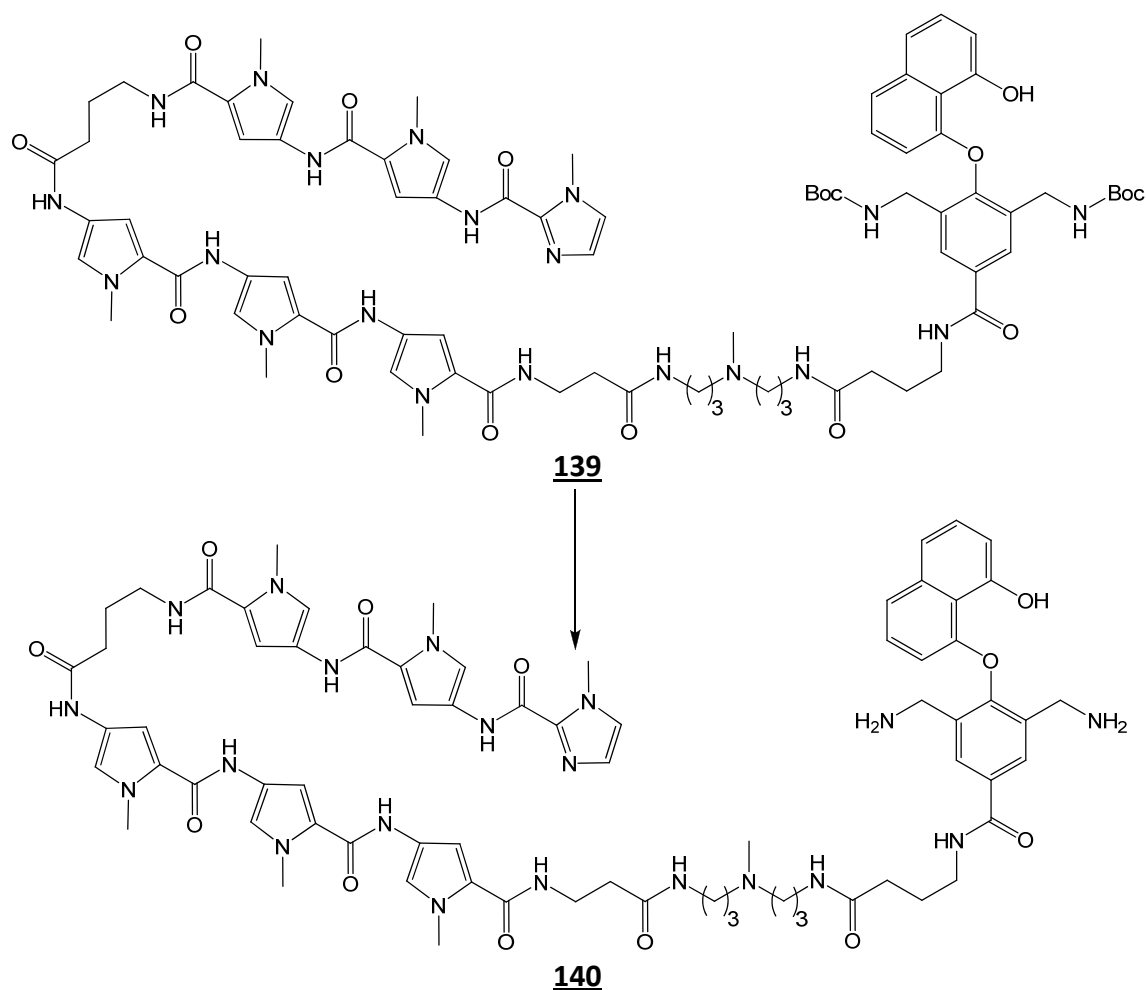
Die Aufreinigung war in diesem Fall etwas schwieriger, da durch eine alleinige Säulenchromatographie kein reines Produkt erhalten werden konnte. Konjugat **139** konnte erst durch eine semipräparative HPLC-Trennung als Reinsubstanz erhalten werden.



**Abbildung 6-80:** Vorletzte Stufe der Zielstruktur-Synthese. Für die erfolgreiche Umsetzung musste die Schutzgruppe von **138** zunächst entfernt werden, um das entstehende Amin dann mit **88** zum Produkt **139** zu koppeln.

Die letzte Reaktion betrifft die Funktionalisierung der (noch) Boc-geschützten Amine. Die Entfernung der Schutzgruppen ist in diesem Fall nicht mehr so einfach, vergleicht man sie mit den vorigen Reaktionen. Nach der normalen Prozedur der Entschützung ist noch immer ein großer Anteil der Boc-Schutzgruppen vorhanden. Daher muss diese Prozedur doppelt durchgeführt werden, indem man nach der üblichen Reaktionszeit nochmals frische methanolische  $\text{HCl}^{\text{VI}}$  zugibt und die Reaktionszeit somit insgesamt verdoppelt. Nach der Evaporation der methanolischen Lösung und Trocknung erhält man praktischerweise auch gleich das  $\text{HCl}$ -Salz der Verbindung **140**. Es ist aber davon auszugehen, dass **140** nicht als Trihydrochlorid vorliegt, sondern als multiples Salz (vgl. Seiten 80 und 81).

<sup>VI</sup> Für zukünftige Reaktionen kann testweise auch 80 % TFA in DCM getestet werden. Nach Trocknung zurückbleibende TFA sollte die Reaktion mit **93** nicht stören.

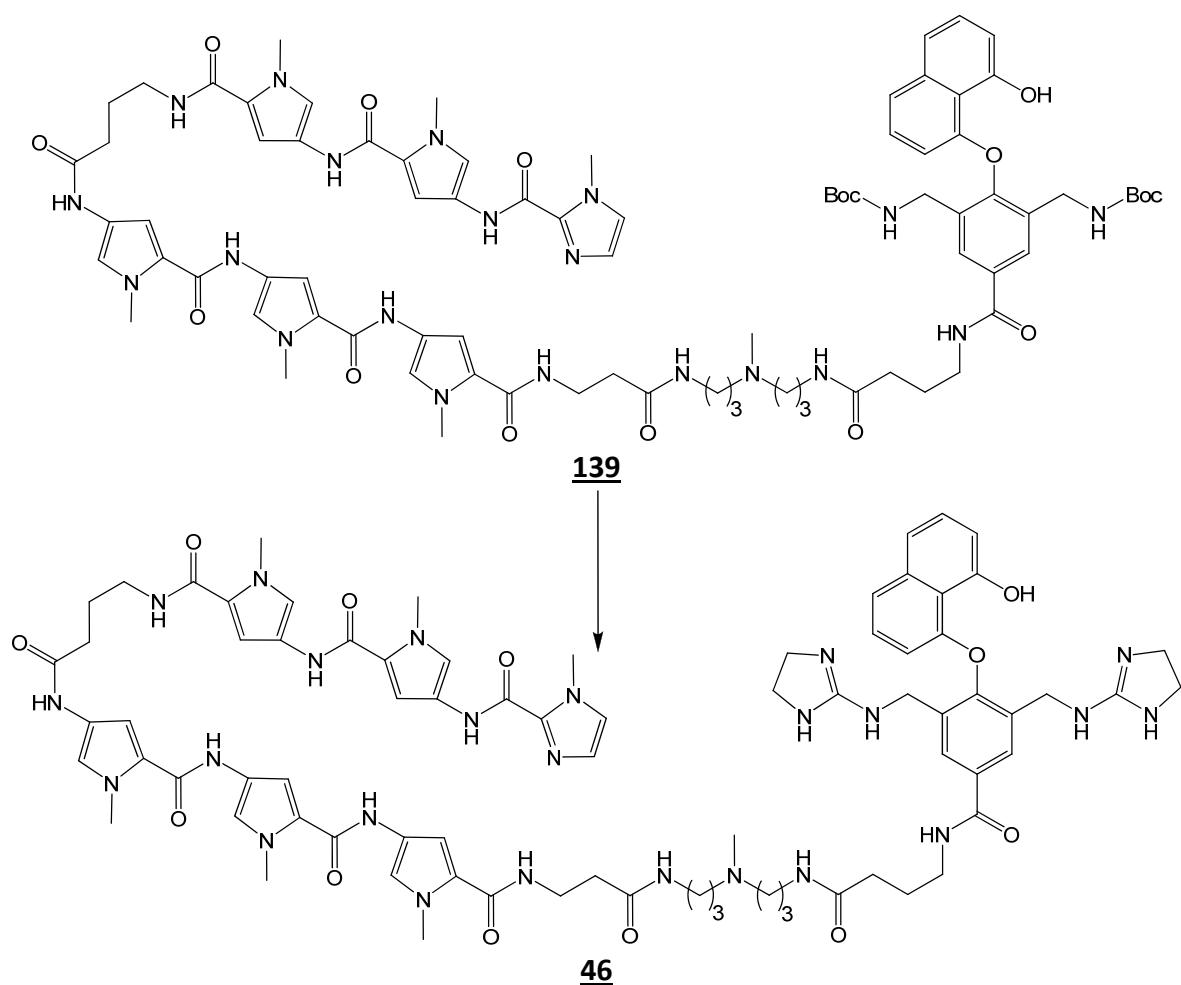


**Abbildung 6-81:** Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen von **139** mit methanolischer HCl. Die Bedingungen mussten für diese Reaktion angepasst werden, damit man eine vollständige Entfernung der Schutzgruppen bewirken kann.

Durch die sehr hohe Polarität von **140** war eine Säulenchromatographie nicht möglich. Hier musste dann per Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt werden. Nach der Aufreinigung liegt **140** aber als TFA-Salz vor, was einen weiteren Folgeschritt mit einer Dowex-Ionentauschersäule notwendig macht.

Das Diamin **140** stellt als Chlorid-Salz eine interessante Verbindung für Spalt-Experimente mit DNA dar und wurde auf verschiedene Eigenschaften hin untersucht (siehe Kapitel 7.3.8).

Um das Zielmolekül **46** zu erhalten, mussten noch die beiden Guanidine aufgebaut werden. Geht man dabei von **140** aus, kann man das Diamin direkt in MeOH/DIEA mit **93** umsetzen. Nutzt man aber **139** als Startpunkt, so wird das Diamino-Intermediat nach Entfernung der Schutzgruppen nicht weiter aufgereinigt, sondern direkt weiter umgesetzt.

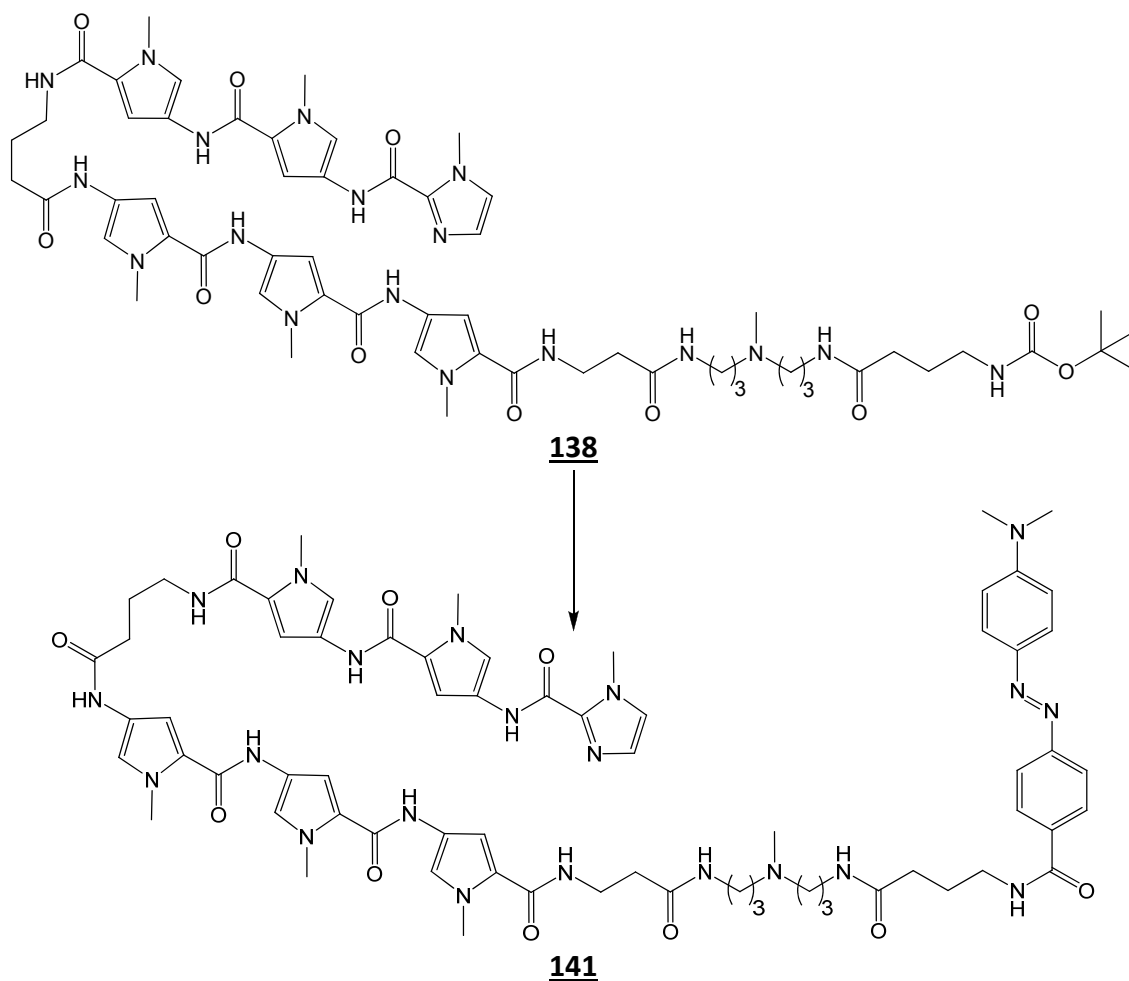


**Abbildung 6-82:** Reaktion zur Fertigstellung des Zielmoleküls **46**. Das nach Entfernung der Amino-Schutzgruppen entstehende Intermediat wird hier nicht weiter aufgereinigt, sondern direkt nach Trocknung mit **93** zur Reaktion gebracht.

Wie schon bei den Reaktionen zum Guanidin-Aufbau zuvor, verläuft die Reaktion mit **93** sehr schnell. Wie schon bei **140** kann **46** nicht durch eine Säulenchromatographie, sondern nur durch reversed-phase-HPLC aufgereinigt werden. Das dabei anfallende TFA-Salz wurde wieder mit einer Ionentauschersäule in das Chlorid-Salz überführt, und wurde danach in diversen Experimenten mit DNA weiter untersucht (siehe Kapitel 7.3.9).

Eine Derivatisierung von **46** zum Bismannich-Analog (vgl. **40**) wurde nach einer Testreaktion mit **113** nicht mehr durchgeführt. In diesem Test konnte eine schnelle Umsetzung von **113** mit dem Eschenmoser-Salz beobachtet werden, die darauf schließen lässt, dass man in einer Derivatisierung von **46** keine selektive Alkylierung am Naphthol-Teil erhält, sondern dass auch die Heterozyklen des Polyamid-Teils reagieren werden. Es ist auch nicht möglich, die Mannich-Basen früher einzuführen, denn das Mannich-Produkt wurde von Z. Nazir als säureempfindlich beschrieben, und es müssten damit mehrere Boc-Entschützungen durchlaufen werden.

Wie schon zuvor (siehe *Abbildung 6-73*) ist das Polyamid **138** dann noch mit dem Azofarbstoff DABCYL zur Reaktion gebracht worden, um die in Kapitel 7.2 beschriebenen Experimente zur Fluoreszenz-Titration durchführen zu können.



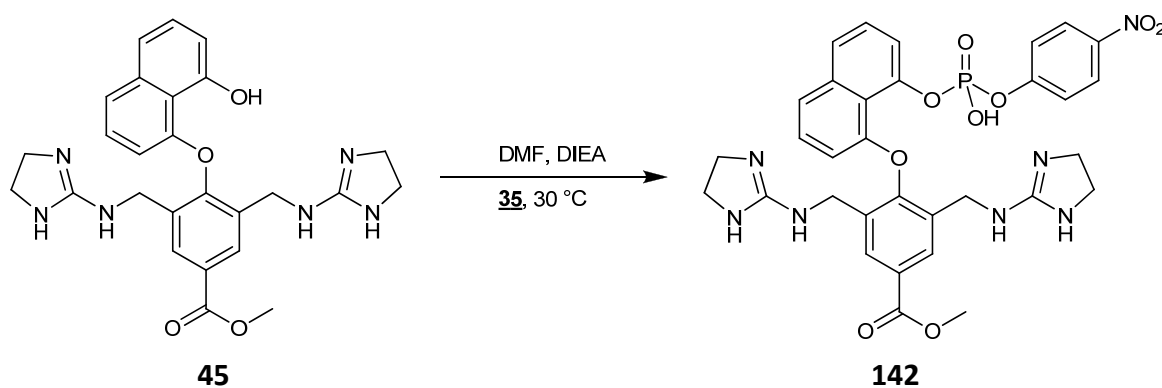
**Abbildung 6-83:** Darstellung des DABCYL-konjugierten Polyamides **141** zur Durchführung von Orientierungsstudien in der *minor groove* von DNA-Duplexen.

Das Konjugat **141** ließ sich analog zu **139** herstellen, indem zunächst die Boc-Schutzgruppe von **138** entfernt, und dann das freie Amin mit DABCYL umgesetzt wurde.

Diese Derivatisierung gelang unter Verwendung von Standard-Reagenzien wie DIC/HOBt (*Abbildung 6-83*). Ein Vorteil bei der Verwendung von DABCYL besteht darin, dass das Produkt automatisch farblich markiert ist und sowohl bei der anschließenden Säulen-chromatographie als auch bei DC-Analytik leicht zu identifizieren war. Das erhaltene Produkt lag jedoch nicht elementaranalysenrein vor.

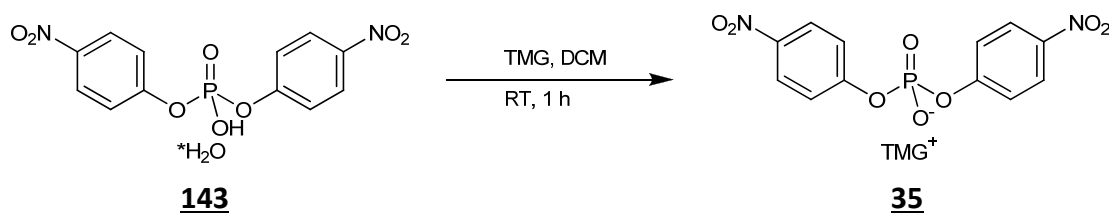
### 6.3 Kinetik-Messung

Um einen Vergleichswert zu **36** zu bekommen und um zu sehen, ob bzw. wie sehr die Ester-Funktion von **45** die Reaktivität beeinflusst, ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung von **45** (als Chlorid-Salz) mit dem Phosphat **35** in das phosphorylierte Produkt **142** nach dem Schema in *Abbildung 6-84* für diese Arbeit mit der RP-HPLC bestimmt worden.



**Abbildung 6-84:** Schema der in der Kinetik beobachteten Modellreaktion von **45** mit **35** zu **142**. Die Abnahme der Konzentration von **45** und die Zunahme von 4-Nitrophenol (nicht gezeigt) wurden dabei per HPLC bestimmt.

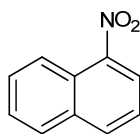
Das verwendete BNPP-Modellphosphat **35** ist kommerziell nur als Hydrat **143** verfügbar, und wurde daher nach einer Vorschrift von M. Muche in das TMG-Salz überführt<sup>[44]</sup>, denn ohne TMG läuft die obige Reaktion nicht ab.



**Abbildung 6-85:** Umwandlung des Modellphosphates **35** vom Hydrat in das TMG-Salt.

Damit die Vergleichbarkeit zur Vorgängerarbeit gewährleistet bleibt, wurden die apparativen Bedingungen konstant gehalten (diese sind in Kapitel 10.6. näher beschrieben), und die Konzentrationsabnahme von **45** bzw. die –zunahme von 4-Nitrophenol anhand der HPLC-Eluationsprofile bestimmt.

Um für den verwendeten UV-Detektor eine Bezugsgröße zu haben, wurde der Reaktion noch das unter den verwendeten Bedingungen inerte Nitronaphthalin **144** in definierter Menge als interner Standard zugegeben, und für die Substanzen **45** und 4-Nitrophenol die Eichfaktoren bestimmt.

**144**

**Abbildung 6-86:** Der verwendete interne Standard 1-Nitronaphthalin für die HPLC. Die Substanz wurde vor dem Einsatz aus Hexan umkristallisiert.

Die Kinetik-Messung ist dann wie in Kapitel 10.6 beschrieben durchgeführt und ausgewertet worden, und lieferte die scheinbare Geschwindigkeitskonstante  $k_{obs}$ :

$$k_{obs} = 2.21 * 10^{-4} \text{ min}^{-1}$$

Dieser Wert für **45** unterscheidet sich nur wenig von der zuvor von Z. Nazir bestimmten Konstante für **36**. Daraus ist zu schließen, dass sich die beiden Moleküle **45** und **36** in ihrer Spaltaktivität kaum unterscheiden und dass der Ester von **45** keinen Einfluss auf die Aktivität ausübt.



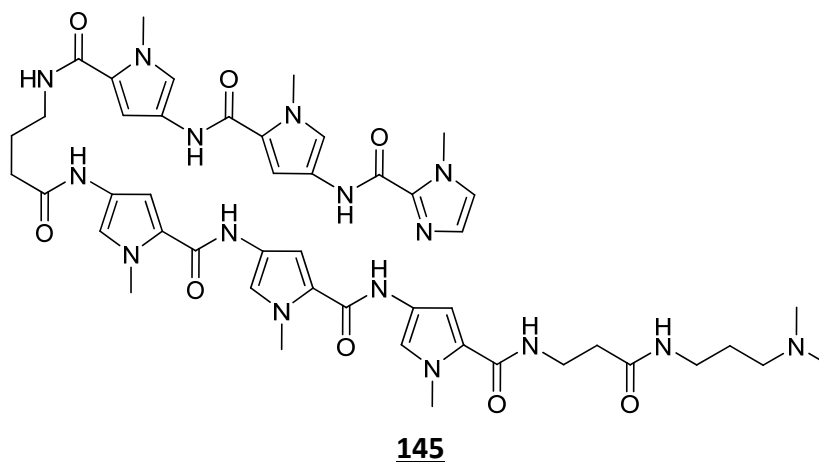


## 7. IN VITRO-EXPERIMENTE MIT DNA

Um die in Kapitel 6 beschriebenen und dargestellten Zielmoleküle anschließend näher untersuchen zu können, wurden zunächst diverse Experimente zur Bindung und Orientierung der Polyamide in der *minor groove* von Duplex-DNA durchgeführt. Mit den daraus gewonnenen Kenntnissen sind dann verschiedenartige Eigenschaften der Spaltreagenzien an Plasmid- und normaler Doppelstrang-DNA bestimmt worden, die im Folgenden beschrieben und diskutiert werden.

### 7.1 Experimente zu den Bindungseigenschaften von Polyamiden im Komplex mit DNA

Das Polyamid **138** ist ein Derivat der Zielstruktur **145** aus der Diplomarbeit des Autors. Wie aus *Abbildung 7-1* ersichtlich wird, unterscheidet sich **138** von **145** teilweise im verwendeten Spacer, aber nicht in der Reihenfolge der Heterozyklen.



**Abbildung 7-1:** Während der Diplomarbeit via SPPS hergestelltes Hairpin-Polyamid.

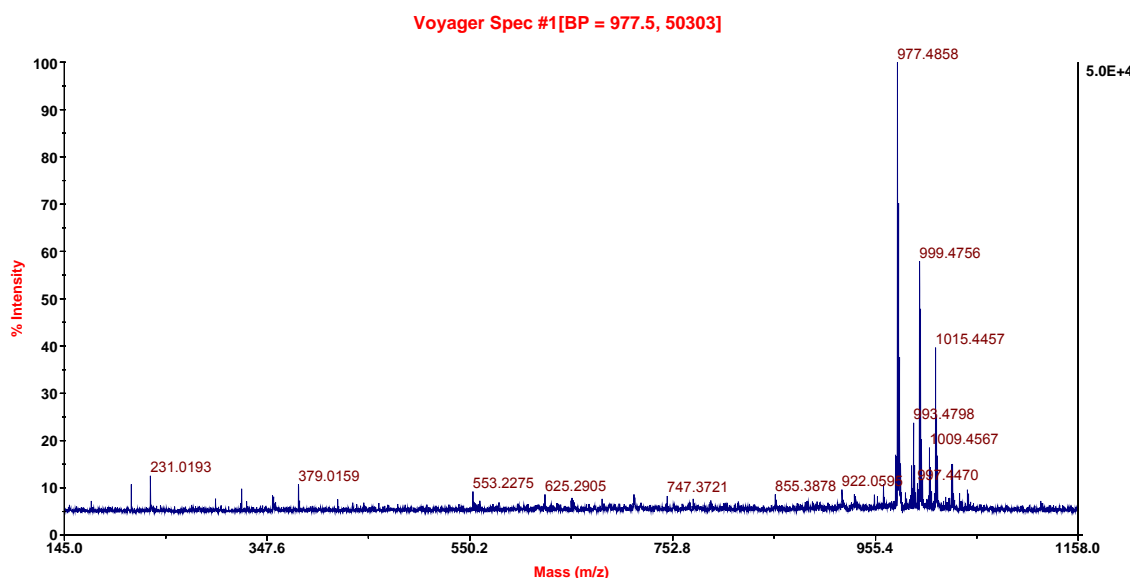
Laut Literatur<sup>[113]</sup> bindet das Polyamid **145** mit sehr hoher Affinität ( $K_a = 2.9 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_d = 3.4 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ ) an Duplex-DNA mit der Sequenz 5'-TGTTA-3', und daher ist davon auszugehen, dass **138** als Analog zu Polyamid **145** ebenfalls an die oben beschriebene DNA-Sequenz bindet.

Um die generelle Affinität dieser Distamycin-Derivat-Dimere für A/T-reiche DNA-Sequenzen zu überprüfen, wurde Molekül **145** von C. Hunger aus der Arbeitsgruppe M. Karas massenspektrometrisch in mehreren Experimenten untersucht<sup>[129]</sup>.

### 7.1.1 Charakterisierung mit MALDI-MS

Zunächst wurde ein hochauflösendes MALDI-Massenspektrum der Verbindung **145** aufgenommen, um die Reinheit der Substanz bestimmen zu können (siehe *Abbildung 7-2*) und einen weiteren Hinweis auf die korrekte Konstitution zu erhalten (die weitere Analytik zu **145** ist in der Diplomarbeit zu finden).

Man kann in der Darstellung in *Abbildung 7-2* einen Hauptpeak der Masse 977.4858 u ablesen, was genau der berechneten Masse von **145**+H<sup>+</sup> entspricht. Das Signal bei 999.4756 u beschreibt **145**+Na<sup>+</sup>, das bei 1015.4457 u **145**+K<sup>+</sup>.

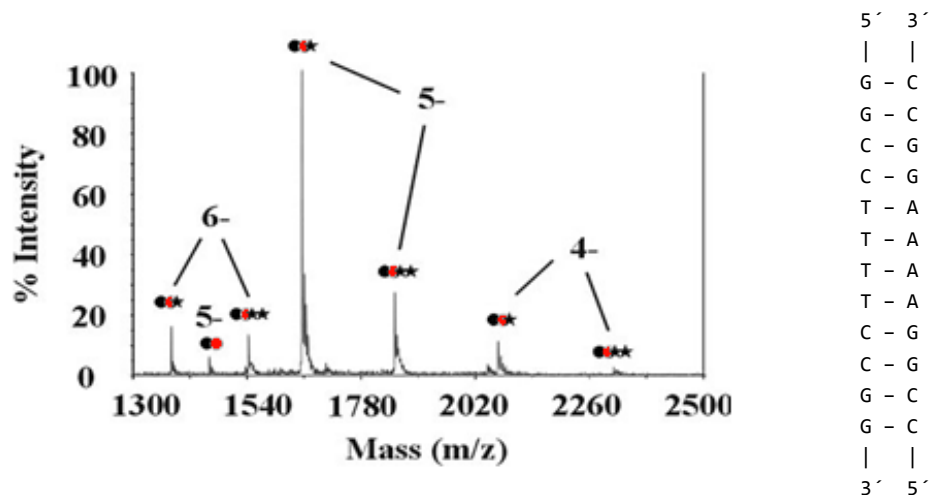


**Abbildung 7-2:** High-Res-MALDI-MS-Analyse des Polyamids **145**. Der Peak bei 977.4858 zeigt die Masse für **145**+H<sup>+</sup> an. Die Werte 999.4756 und 1015.4457 stehen für **145**+Na<sup>+</sup> bzw. für **145**+K<sup>+</sup>.

### 7.1.2 Bindungs-Experimente mit ESI-MS

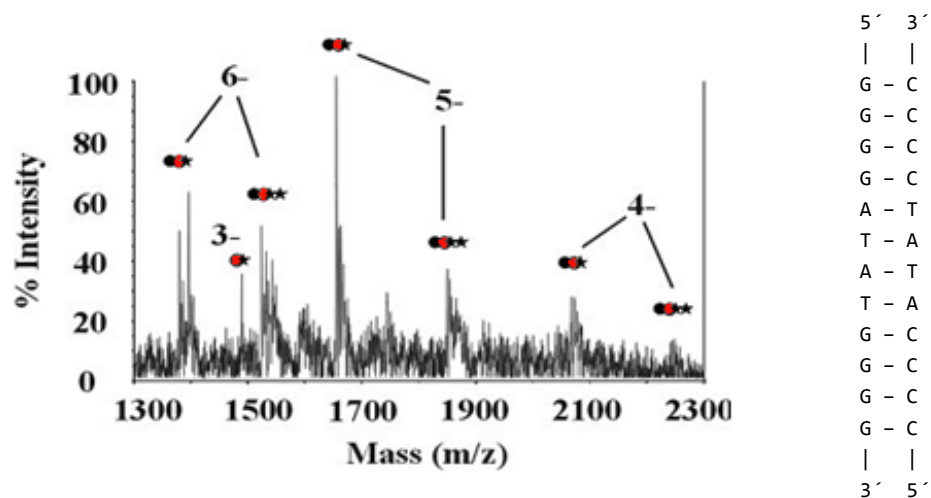
Die ESI-Experimente sind allesamt nach dem gleichen Schema durchgeführt worden: zwei DNA-Einzelstränge (in den Abbildungen gekennzeichnet durch die Symbole ● und ●) werden mit dem Polyamid (dargestellt durch einen Stern) zusammen vermessen (die genauen experimentellen Bedingungen sind an anderer Stelle beschrieben<sup>[129]</sup>). Die verwendeten DNA-Stränge sind jeweils rechts neben dem Massenspektrum gezeigt.

So sieht man in *Abbildung 7-3* eine Dominanz des Komplexes aus dem DNA-Duplex und einem Polyamid-Molekül.



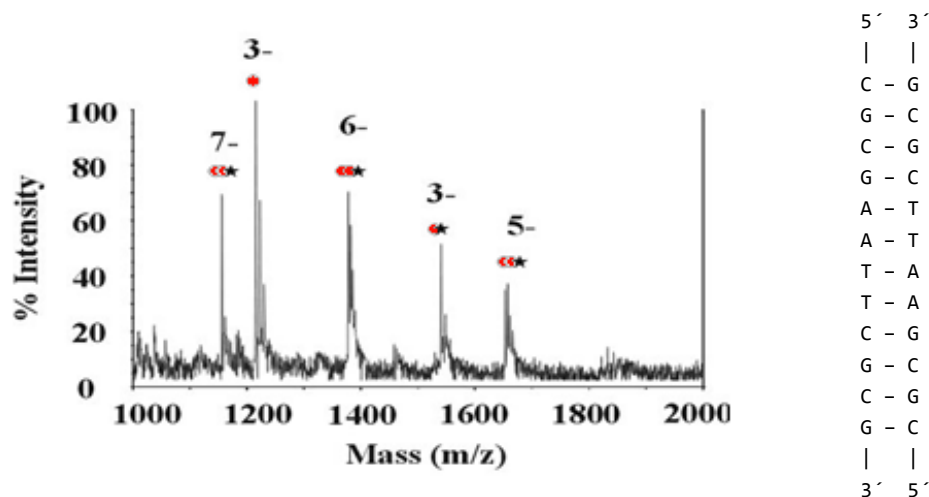
**Abbildung 7-3:** ESI-MS-Analyse des Komplexes eines DNA-Duplex (rechts) mit Polyamid 145. Hier stehen die Kreise (● und ●) für die einzelnen DNA-Stränge und der Stern (\*) für das Polyamid 145. Deutlich ist ein besonders großer Peak sichtbar, der für einen DNA-Duplex + 145 steht.

Das Experiment wurde mit einem DNA-Duplex wiederholt, welcher A und T alternierend enthält. Das Spektrum lässt den Schluss zu, dass A und T tatsächlich untereinander austauschbar sind, ohne die Affinität von 145 in großem Maße zu verändern.



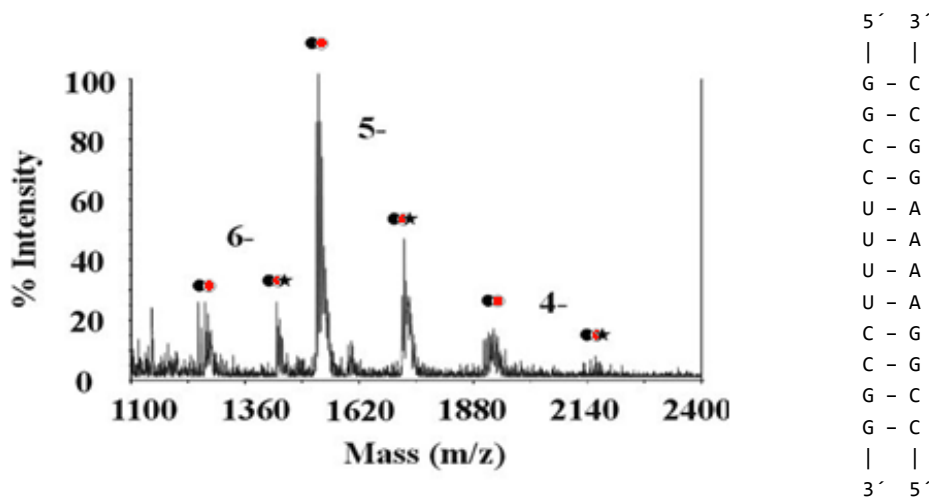
**Abbildung 7-4:** ESI-MS-Analyse des Komplexes eines DNA-Duplex anderer Sequenz mit Polyamid 145. Das Experiment bestätigt die Affinität zu A und T. Die Kreise (● und ●) in der Abbildung stehen für die einzelnen DNA-Stränge und der Stern (\*) für das Polyamid 145.

Das oben dargestellte Experiment wurde auch mit dem Dickerson-Dodecamer durchgeführt. Hier sieht man ebenfalls überwiegend Signale, die für den Komplex aus DNA-Duplex und Hairpin-Polyamid stehen (neben einem Peak für den nicht hybridisierten DNA-Einzelstrang).



**Abbildung 7-5:** ESI-MS-Analyse des Komplexes vom Dickerson-Dodecamer-DNA-Duplex mit Polyamid 145. Da die beiden DNA-Stränge Palindrome und damit gleich sind, taucht in der Abbildung nur ein Kreis (●) für den DNA-Strang und der Stern (\*) für das Polyamid 145 auf.

Im letzten Experiment wurde untersucht, ob das Polyamid auch an DNA/RNA-Hybrid-Duplexe bindet. Wie man in dem Massenspektrum in *Abbildung 7-6* sehen kann, steht der größte Peak für den Hybrid-Duplex ohne gebundenes Polyamid. Dies ist ein Hinweis auf eine besondere DNA-Duplex-Präferenz des Polyamides.



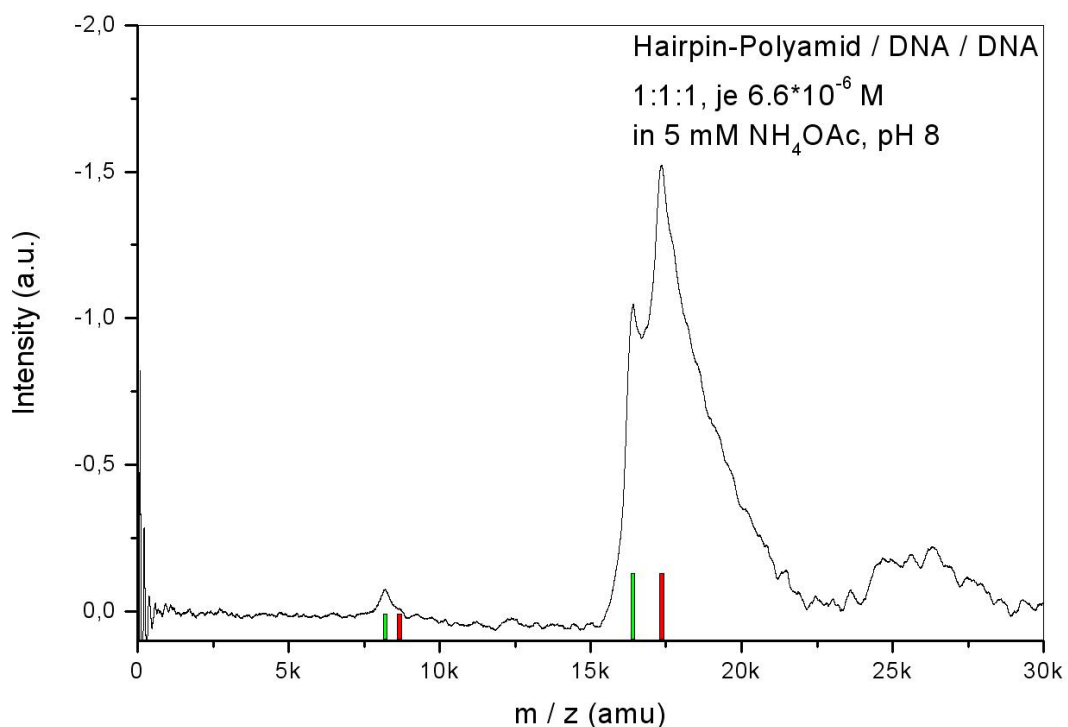
**Abbildung 7-6:** ESI-MS-Analyse des DNA-RNA-Hybrid-Duplexes mit Polyamid 145. Die Kreise (● und ●) in der Abbildung stehen für die einzelnen Nukleotid-Stränge und der Stern (\*) für das Polyamid 145. Man kann gut erkennen, dass hier deutlich weniger Komplexe mit 145 detektiert wurden.

### 7.1.3 Bindungs-Experimente mit LILBID-MS

Als Alternative zu den etablierten MS-Methoden wie MALDI und ESI sollte auch noch eine neue Spektrometrie-Methode angewandt werden, die LILBID genannt wird. Dieses Akronym steht für *L*aser-*i*nduced *l*iquid *b*ead *i*on *d*esorption und wurde 1996 von der Arbeitsgruppe von B. Brutschy vorgestellt<sup>[130]</sup>. Sie ist als milde Massenspektrometrie-Methode für nicht-kovalente biologisch relevante Molekülkomplexe (wie z.B. Enzym-Substrat- oder Rezeptor-Ligand-Komplexe) gedacht, und es ist damit möglich, solche Komplexe ohne Fragmentierung von der flüssigen in die Gasphase zu überführen und zu vermessen. Detailreiche Beschreibungen über Apparatur, Funktionsweise und Experimente sind auch schon publiziert worden<sup>[131]</sup>.

Für die LILBID-Experimente, wurde zunächst das  $\text{Na}^+$ -Gegenion der DNA gegen  $\text{NH}_4^+$  ersetzt, und die DNA-Stränge dann zusammen mit **145** inkubiert.

So kann man in *Abbildung 7-7* erkennen, dass der DNA-Duplex (gekennzeichnet durch einen grünen Balken) überwiegend als 1:1-Komplex mit dem Polyamid **145** (dargestellt durch einen roten Balken) vorliegt. Die Peaks links stammen vom 2fach geladenen Duplex.

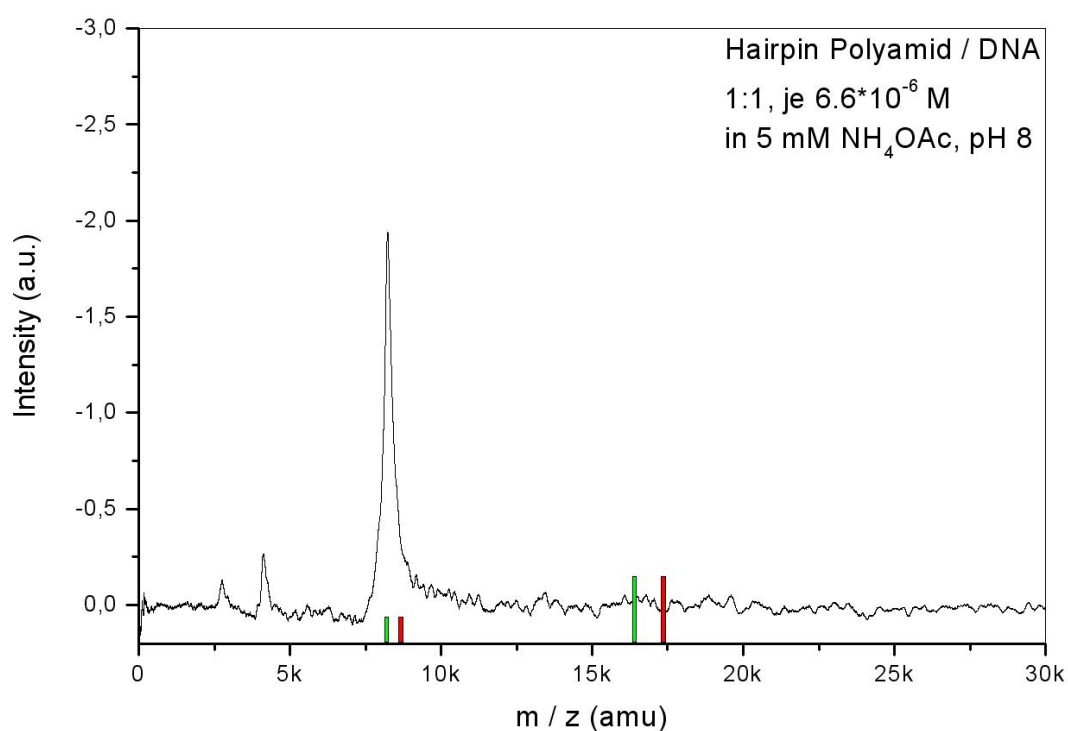


**Abbildung 7-7:** LILBID-MS-Analyse des DNA-Duplexes mit Polyamid **145**. Der grüne Balken zeigt die Masse bzw. halbe Masse des DNA-Duplexes an, der rote steht für den Komplex aus DNA-Duplex und Polyamid. Als größter Peak ist hier eindeutig der Komplex aus Duplex und **145** zu nennen.

Um noch weitere Beweise dafür zu bekommen, dass **145** auch wirklich nur an Duplex-DNA bindet, wurde das Experiment mit nur einem der beiden DNA-Stränge und dem Polyamid durchgeführt. Das Ergebnis ist in *Abbildung 7-8* dargestellt.

Man sieht eindeutig nur einen Peak, der der Masse des DNA-Stranges ohne gebundenes **145** entspricht (wieder dargestellt durch einen grünen Balken). Auch ist kein Peak bei der doppelten Masse zu erkennen, was beweist, dass sich kein DNA-Dimer bildet. Für DNA-Polyamid-Komplexe (rote Balken) sind im gesamten Spektrum keine Peaks zu finden.

Diese Ergebnisse bestätigen die ESI-Experimente aus Kapitel 7.1.2, welche schon gezeigt haben, dass diese Polyamide spezifisch an DNA-Duplexe binden.



**Abbildung 7-8:** LILBID-MS-Analyse der Mischung eines einzelnen DNA-Stranges und dem Polyamid **145**. Man kann erkennen, dass sich mit einem DNA-Einzelstrang und dem Polyamid **145** kein Komplex bildet.

## 7.2 Experimente zur Orientierung des Polyamids im Komplex mit DNA

Zur Überprüfung der Orientierung des Hairpin-Polyamids in der *minor groove* sollte eine Fluoreszenz-Titration durchgeführt werden, wobei ausgenutzt wird, dass DABCYL mit Fluorescein ein Quench-Paar bildet. Dazu wurde das DABCYL-markierte Molekül **141** hergestellt, und ein DNA-Duplex am 5'-Ende mit Fcn markiert.

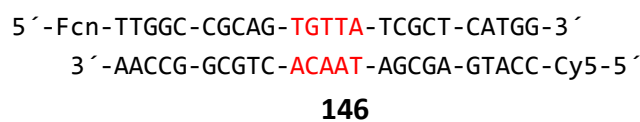
Die beiden DNA-Stränge wurden so gewählt, dass sie jeweils eine Länge von 25 Basen haben und dabei keinerlei Selbstkomplementarität besitzen<sup>[VII]</sup>:

**Tabelle 7-1:** Physikalische Eigenschaften und Sequenzen der verwendeten DNA-Stränge

	Sequenz	Gegenion	MW [g/mol]	T <sub>m</sub> [°C]
DNA 1	5'-Fcn-TTGGC-CGCAG-TGTTA-TCGCT-CATGG-3'	Na <sup>+</sup>	8217	61
DNA 2	5'-Cy5-CCATG-AGCGA-TAACA-CTGCG-GCCAA-3'	Na <sup>+</sup>	8179	61

Der zweite Strang ist mit Cy5 markiert, um in späteren Experimenten zur DNA-Spaltung die entstehenden Fragmente auch sequenzieren zu können.

Die beiden einzelnen Stränge werden kurz vor dem Einsatz in den entsprechenden Experimenten hybridisiert und ergeben dabei folgenden Duplex:



**Abbildung 7-9:** Der für die Bindungs- und Spaltexperimente verwendete DNA-Duplex. Die Bindesequenz des Polyamides ist rot markiert.

Molekül **131** hat gezeigt, dass eine Polyamid-Struktur allein nicht ausreichend für eine starke Bindung an DNA-Duplexe ist, denn in massenspektrometrischen Experimenten konnte keine Bindung nachgewiesen werden.

Aus diesem Grund sollte die bindende Eigenschaft des Polyamides **141** an die DNA überprüft werden, weil dies eine notwendige Voraussetzung für die folgende Quench-Titration ist. Das angefärbte Gel in *Abbildung 7-10* zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung, wobei kein signifikanter Lauf-Unterschied zwischen dem DNA-Duplex in Lane 3 und DNA-Duplex plus **141** in Lane 4 zu sehen ist.

Die Bindung ist somit durch Gelelektrophorese nicht eindeutig nachzuweisen.

<sup>VII</sup> geprüft *in silico* mit RNAstructure; <http://rna.chem.rochester.edu/>



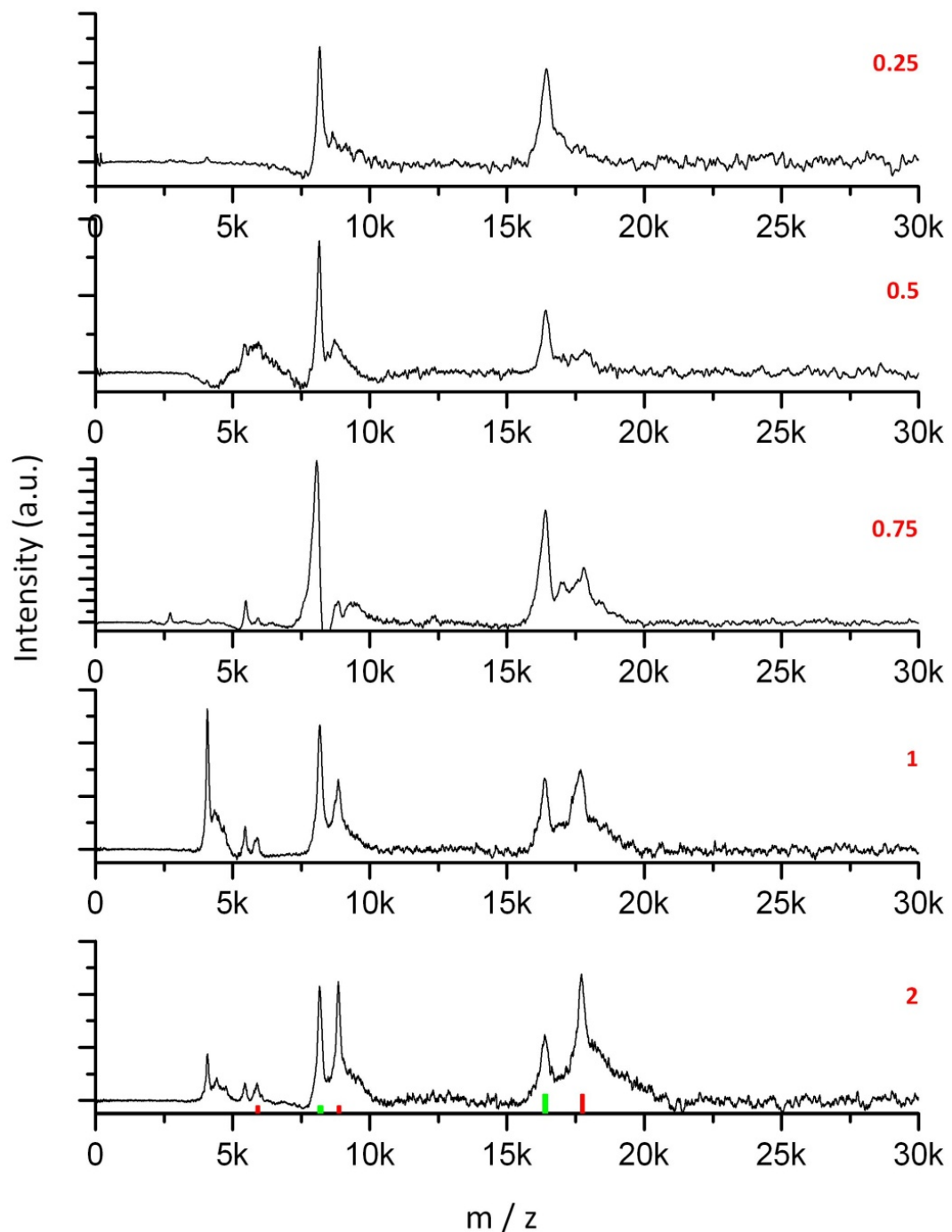
**Abbildung 7-10:** Gel-Elektrophorese von DNA 146 und 141 unter nativen Bedingungen, um eine Bindung des Polyamids an die DNA per Band-Shift nachzuweisen. Es ist jedoch kein signifikanter Shift zu erkennen, und daher ist durch dieses Experiment eine Bindung nicht eindeutig nachweisbar. Die Banden wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

Um doch noch einen Hinweis auf die bindenden Eigenschaften von 141 zu erhalten, sollte eine Mischung aus der Duplex-DNA und dem Polyamid 141 massenspektrometrisch per LILBID untersucht werden.

Dabei wurde die DNA 146 jeweils mit 0.25, 0.5, 0.75, 1 oder 2 eq. 141 gemischt und anschließend untersucht. Die *Abbildung 7-11* zeigt ab einer Menge von 0.75 eq. 141 die stetige Zunahme eines Peaks bei  $m/z \sim 17500$ , welcher für den Komplex aus dem Duplex 146 und einem Molekül 141 steht (in der Abbildung markiert durch einen roten Balken). Im selben Maße wird der Peak für den freien Duplex 146 bei  $m/z \sim 16000$  (symbolisiert durch einen grünen Balken) immer kleiner. Die beiden Balken (rot und grün) zwischen  $m/z$  7500 und 10000 stehen dabei für die doppelt geladenen Moleküle.

Der Nachweis des Komplexes von 146 und 141 ist die notwendige Voraussetzung für das folgende Experiment zur Bestimmung der Orientierung von 141 in der *minor groove*.

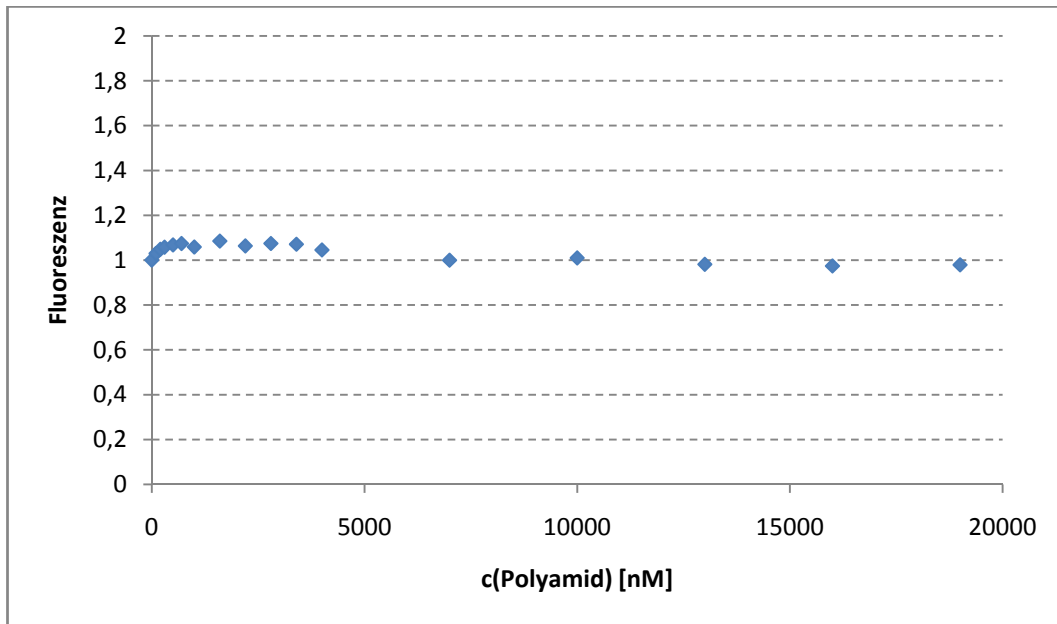




**Abbildung 7-11:** LILBID-MS-Analyse einer Mischung des DNA-Duplexes **146** und **141**. Die Menge der DNA ist in allen 5 Experimenten gleich; die rote Zahl rechts gibt jeweils die Äquivalente von **141** an. Man kann hier einen das Entstehen eines Peaks bei etwa 17.5k (roter Balken, DNA-Duplex plus **141**) und die Abnahme des Peaks bei etwa 16k (grüner Balken, DNA-Duplex) beobachten.

Um zunächst auszuschließen, dass frei diffundierendes **141** einen Quench-Effekt ausübt, wurde die erste Titration ohne DNA und nur gegen Fcn durchgeführt.

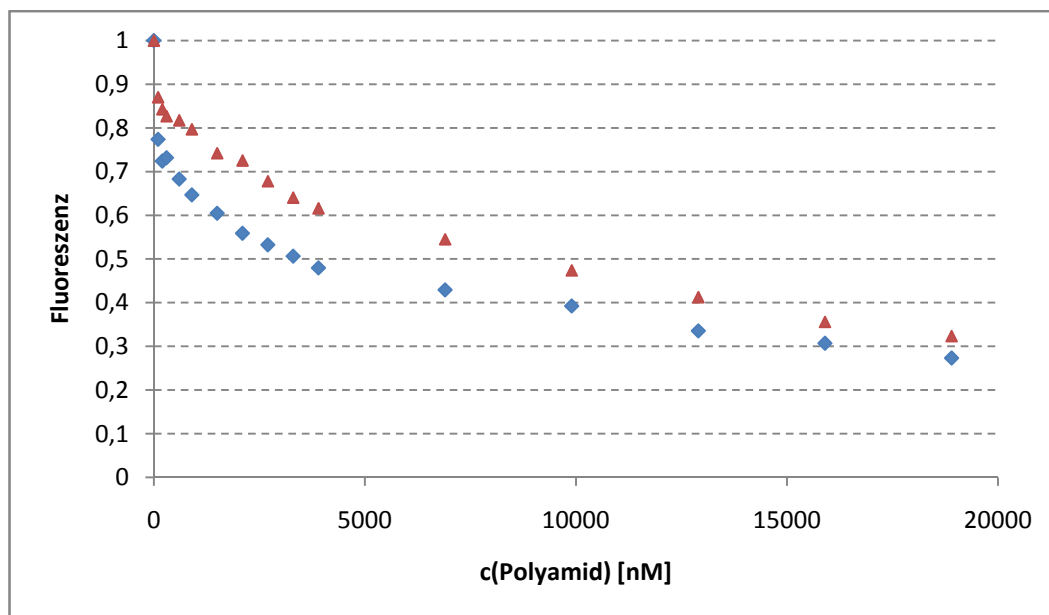
Wie man nun aus der Grafik in *Abbildung 7-12* entnehmen kann, übt freies **141** keinen Quench-Effekt aus, denn die Fluoreszenz bleibt über die gesamte Titration konstant.



**Abbildung 7-12:** Kontroll-Titration von **141** gegen Fluorescein (20 nM) zum Ausschluss eines Quench-Effektes von nicht an DNA-komplexiertem Polyamid.

Die *Abbildung 7-13* zeigt 2 Titrations, in deren Verlauf die Fluoreszenz mit zunehmender Konzentration von **141** immer weiter abnimmt. Es ließ sich hier also ein Quench-Effekt nachweisen. Die Kurven sinken allerdings bis unter einen Wert als 0,5 ab, was für unspezifische Bindungen an die DNA ab einer bestimmten Konzentration von **141** spricht.

Aus diesen Daten kann gefolgert werden, dass das Polyamid **141** in N→C-Richtung an die Sequenz 5´-TGTTA-3´ bindet.



**Abbildung 7-13:** Fluoreszenz-Titration von **141** und dem Fluorescein-markierten DNA-Duplex (100 nM). Die y-Achse wurde zur einfacheren Darstellung auf 1 normiert.

### 7.3 Experimente zur DNA-Spaltung

Ein geeignetes Modell-System für den Nachweis der DNA-Spaltung und zur Bestimmung der Reaktivität ist die Umwandlung von supercoiled Plasmid-DNA (Form I) in die nicked- bzw. open-circle-Form (Form II), oder sogar in die linearisierte DNA (Form III).

Diese „superspiralisierten“ Plasmide weisen durch ihre – verglichen mit normaler, offenkettiger B-Form-DNA – unübliche DNA-Konformation eine höhere Reaktivität bezüglich der Phosphodiester auf, als normale B-Form DNA sie besitzt. Durch Spaltung von einem der beiden DNA-Stränge kann sich die DNA entwinden und so die zuvor vorhandene Spannung vermindern. Diese Entspannung führt zu einem anderen DNA-Konformer (hier Form II), das eindeutig durch Agarose-Gel-Elektrophorese von der Form I unterschieden werden kann.

Für ein typisches Experiment wird eine Mischung aus dem pUC19-Plasmid (einem high-copy-number Plasmid) und dem jeweiligen Spaltreagenz bei vorher definierten Parametern wie pH, Puffer, Temperatur und Zeit inkubiert, und die Reaktion anschließend gelelektrophoretisch analysiert. Die Gele lassen sich danach photographisch mit einer geeigneten Software auswerten, und die Spalteffizienz quantifizieren (es soll hier erwähnt werden, dass Form II und Form III stets addiert wurden, um die Gesamt-Spaltung zu bestimmen).

Dieses System ist literaturbekannt und kam auch in Vorgängerarbeiten schon zum Einsatz. Es soll aus den genannten Gründen beibehalten werden.

Eine Erweiterung der Spalt-Experimente stellt die Verwendung von normaler, linearer Duplex-DNA dar, die statt Plasmid-DNA mit den Spalt-Reagenzien inkubiert wird. In den Vorgängerarbeiten konnte solch ein Doppelstrang bislang noch nicht gespalten werden, bzw. wurde noch nicht als Substrat eingesetzt.

Es soll an dieser Stelle darauf hingewiesen sein, dass die Ergebnisse aus den hier vorgestellten Experimenten letztlich zu einer Schlussfolgerung bezüglich der Reaktivität der Verbindungen führen, und ob oder wie die eine oder andere Verbindung in Zukunft weiterentwickelt werden soll. Um darüber eine Aussage treffen zu können, muss man die vorhandenen Daten sehr kritisch, sorgfältig und vorsichtig betrachten, da diese Versuchsreihen wesentlich fehleranfälliger und schwieriger in der Reproduktion (verglichen z.B. mit NMR) sind. Um dem Leser ein Maximum an Transparenz zu bieten, wie die jeweiligen Schlussfolgerungen entstanden sind, wurde für die nächsten Seiten eine ungewöhnliche Darstellung der Daten gewählt, bei der sowohl alle Gel-Bilder und verschiedene graphische Darstellungen zu sehen sind, die die Ergebnisse nicht auf einen einzigen Zahlenwert reduzieren.

Im Folgenden werden zunächst die experimentellen Bedingungen und Besonderheiten vorgestellt, die für ein besseres Verständnis der durchgeführten Experimente notwendig sind. Danach findet sich für jedes der sechs Moleküle ein eigenes Kapitel, in dem die Eigenschaften der jeweiligen Substanz genauer beschrieben werden. Die hierfür benötigten Experimente wurden bis auf wenige Ausnahmen allesamt von Dr. Ute Scheffer durchgeführt.

### 7.3.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

#### Agarose-Gel-Elektrophorese:

Für die Gel-Elektrophorese wurde 1 % Agarose und 0.5 µg/ml Ethidium-Bromid (EtBr)<sup>[VIII]</sup> in (1fach)TBE-Puffer verwendet. Der Laufpuffer bestand ebenso aus (1fach)TBE-Puffer mit 0.5 µg/ml EtBr. Der Ladepuffer\*6 bestand aus 40 % Sucrose und 2 mg/ml Croceine-Orange G<sup>[IX]</sup>. Für die Moleküle **45**, **94**, **95** und **97** wurden die Proben mit je 2 µl des Ladepuffers\*6 und 1 µl 20 % SDS<sup>[X]</sup> versetzt, um Präzipitation in der Gel-Tasche zu vermeiden. Die Elektrophorese wurde für 2 bis 3 Stunden bei 120 V durchgeführt.

#### Gel-Fotographien und -Auswertung:

Die Banden wurden unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht, das Gel fotografiert, die Farben des Bildes invertiert und in eine schwarz/weiß-Darstellung überführt. Die quantitative Auswertung erfolgte dann mit der Phoretix 1D-Quantifier-Software.

#### G+A-Leiter:

Die G+A-Leiter wurde nach Literatur-Vorschrift dargestellt<sup>[132]</sup>: Eine Mischung aus 25 µl DNA-Duplex (10 µM), 1 µl Calf Thymus DNA (1 µg/µl), 5 µl Tris-HCl (100 mM, pH 8), 9 µl steriles Wasser und 10 µl 98 %ige HCOOH wird für 35 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wird eine Ethanol-Fällung durchgeführt mit 50 µl des G+A-Ansatzes, 150 µl sterilem Wasser, 50 µl NaOAc (3 M, pH 7), 3 µl Calf Thymus DNA (1 µg/µl) und 750 µl abs. Ethanol. Die Mischung wird über Nacht bei -20 °C gelagert, dann 30 min bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet noch mit 70 % Ethanol gewaschen.

#### Piperidin-Spaltung:

Das Pellet aus der Darstellung der G+A-Leiter wird mit 100 µl einer 1M Piperidin-Lösung aufgenommen und für 30 min bei 90 °C inkubiert. Das Piperidin wird nach

---

<sup>VIII</sup> CAS-Nr. 1239-45-8

<sup>IX</sup> CAS-Nr. 1934-20-9

<sup>X</sup> CAS-Nr. 151-21-3

dieser Zeit über Nacht in der SpeedVac entfernt, der Rückstand mit 15 µl sterilem Wasser aufgenommen und erneut in der SpeedVac aufkonzentriert.

**Plasmid-Präparation:**

Für die Präparation von pUC19-Plasmid wurde das Hi Speed Plasmid Midi-Kit von Qiagen (12643) nach beiliegender Anleitung verwendet.

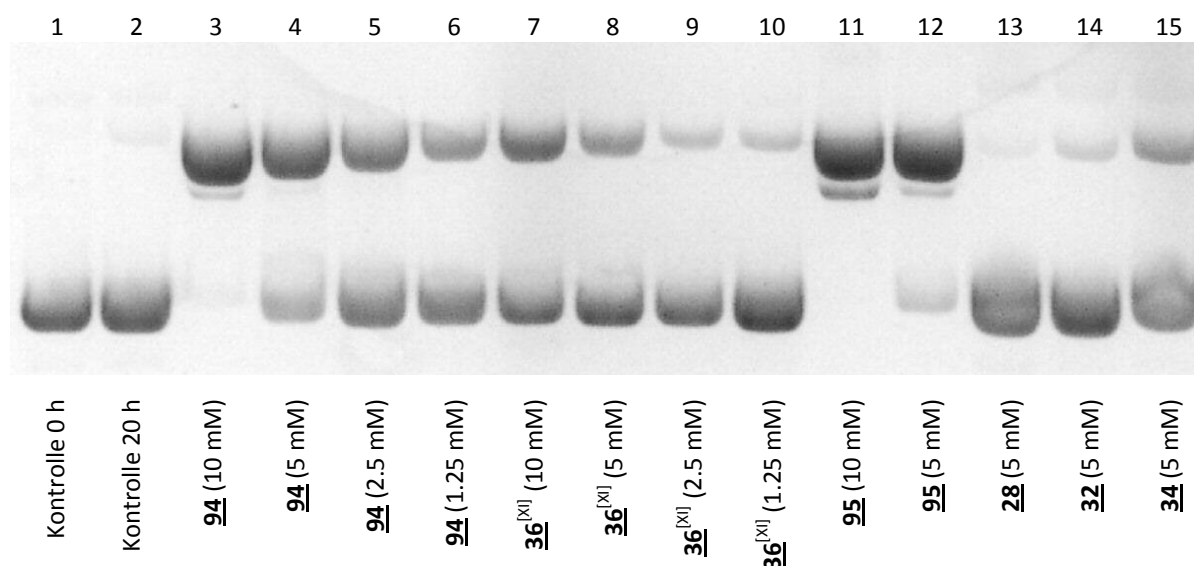
**Spalt-Experimente:**

Soweit nicht anders beschrieben wurden die Spalt-Experimente mit 22.5 nM pUC19-Plasmid in 50 mM HEPES-NaOH bei pH 7 und 37 °C durchgeführt. Die Reaktionszeit betrug 20 h.

### 7.3.2 Vorversuch und Vergleich mit anderen Spaltreagenzien

Einige der in dieser Arbeit dargestellten Moleküle sollten DNA-spaltende Eigenschaften besitzen, da sie Analoga zu erfolgreichen Verbindungen aus Vorarbeiten darstellen.

In einem ersten Übersichts-Experiment wurde pUC19-Plasmid-DNA unter Standard-Bedingungen (siehe Kapitel 7.3.1) mit verschiedenen Spalt-Reagenzien inkubiert. Das Ergebnis der Gel-Elektrophorese ist in *Abbildung 7-14* dargestellt: Lanes 1 und 2 sind Kontrollen (nach 0 h und 20 h respektive), Lanes 3-6 bzw. 7-10 stehen für absteigende Konzentrationen von **94** bzw. **36**<sup>[XI]</sup>, 11 und 12 sind 2 verschiedene Konzentrationen von **95**, und die Lanes 13-15 stehen für verschiedene andere Spalt-Reagenzien aus vergangenen Arbeiten, die zu Vergleichszwecken aufgeführt wurden.



**Abbildung 7-14:** Agarose-Gel-Elektrophorese von pUC19-Plasmid-DNA, die mit diversen Spalt-Reagenzien inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-Form (Form II), darunter linear (Form III), unten supercoiled-Form (Form I). Zur Erklärung von Lanes 3 bis 6 siehe Text.

Nach Auswertung der Kontrollen mit der Phoretix-Software kann man sehen, dass die Plasmid-DNA fast ausschließlich (~ 96 %) supercoiled vorliegt. Bei vielen der weiteren Lanes ist eine (partielle) Umwandlung von Form I in Form II zu beobachten, was man generell als Indikator für Reaktivität sehen kann.

Schon in den Lanes 3 bis 6 zeigte sich eine erste große Überraschung: die Form I wird bei hohen Konzentrationen von **94** annähernd vollständig in Form II umgewandelt, wobei sogar noch zu einem kleinen Teil die Form III auftritt. Die Spaltung ist damit etwa um Faktor 3 besser, als in der Vergangenheit für das Molekül **36**<sup>[XII]</sup> gezeigt werden konnte. Erwartet wurde für **94** eine in etwa gleich große Aktivität im Vergleich zu **36**. Dieser doch recht

<sup>XI</sup> alte Charge von Z. Nazir

<sup>XII</sup> für 5 mM wurde abzüglich Hintergrund eine etwa 20 %ige Spaltung erreicht

beträchtliche Unterschied in der Aktivität könnte auf der freien Carbonsäure-Funktion im Molekül **94** beruhen, mit der im Gegensatz zu **36** prinzipiell lokale Säure-Katalyse möglich wäre, was durchaus einen Einfluss auf die Spaltaktivität haben würde.

Die Lanes 7 bis 10 reproduzieren in diesem Experiment in sehr guter Näherung die Ergebnisse für **36** aus früheren Experimenten, wobei der hier ermittelte Wert für **36** etwa 30% höher liegt, als in der Vergangenheit bestimmt wurde. Die Lanes 11 und 12 zeigen die nächste Überraschung: für die gemessenen Konzentrationen von **95** wurde eine hohe bzw. quantitative Umwandlung in Form II beobachtet. Auch hier war eine solch herausragende Aktivität nicht erwartet worden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte der  $pK_a$ -Wert der Amino-Gruppen sein, der niedriger liegt als der von Guanidinen. So könnten die Amino-Gruppen lokal durch Abgabe eines Protons zur Säure-Katalyse beitragen, und die Reaktivität erhöhen.

Sämtliche ermittelten Werte sind zusammen mit dem errechneten Mittelwert in *Tabelle 7-2* aufgelistet:

**Tabelle 7-2:** Quantifizierung der Umwandlung von Form I in Form II

Lane	Molekül	Form II [%]			Lane	Molekül	Form II [%]		
		Exp1	Exp2	$\emptyset$			Exp1	Exp2	$\emptyset$
1	Kontrolle 0 h	1.3	1.0	1.1	9	<b>36</b> (2.5 mM)	17.7	15.5	16.6
2	Kontrolle 20 h	4.6	3.2	3.8	10	<b>36</b> (1.25 mM)	11.5	10.0	10.7
3	<b>94</b> (10 mM)	95.8	96.4	96.1	11	<b>95</b> (10 mM)	100.0	100.0	100.0
4	<b>94</b> (5 mM)	68.7	65.2	67.0	12	<b>95</b> (5 mM)	86.0	84.2	85.1
5	<b>94</b> (2.5 mM)	44.6	40.9	42.8	13	<b>28</b> (5 mM)	4.2	2.9	3.6
6	<b>94</b> (1.25 mM)	35.5	32.7	34.1	14	<b>32</b> (5 mM)	10.5	7.4	8.9
7	<b>36</b> (10 mM)	45.1	44.3	44.7	15	<b>34</b> (5 mM)	23.8	17.9	20.9
8	<b>36</b> (5 mM)	32.7	27.2	29.9					

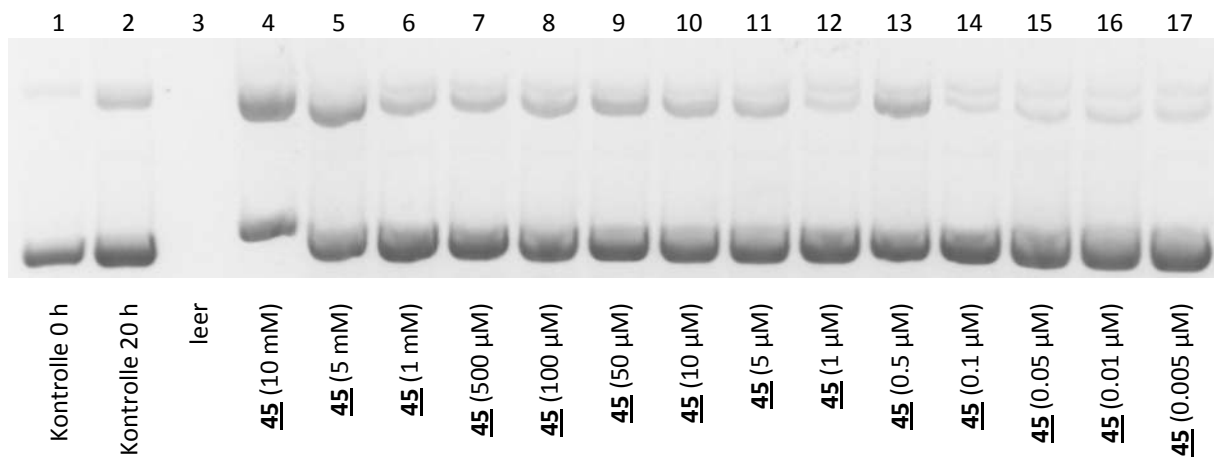
Da die Spalt-Ergebnisse mit **94** und **95** aus diesen Vorversuchen überraschenderweise alle bisherigen Ergebnisse übertrafen, wurden die Verbindungen **94** und **95** eingehender auf ihre Eigenschaften untersucht (siehe hierzu die Kapitel 7.3.4 und 7.3.5).

Zunächst wurden aber Experimente mit **45** durchgeführt, um die Aktivität bzw. den Einfluss des Esters im Vergleich zu **36** bestimmen zu können.

### 7.3.3 Reaktion mit dem Bisguanidinium-Alkohol 45

Im ersten durchgeführten Experiment mit 45 wurde die Aktivität im Konzentrationsbereich von 5 nM bis 10 mM untersucht.

Wie schon in Kapitel 7.3.2 wurde bei Standard-Bedingungen inkubiert. Die Lanes 1 und 2 in *Abbildung 7-15* zeigen wieder die Kontrollen, die Lanes 4 bis 17 die Inkubation mit absteigenden Konzentrationen vom Bisguanidinium-Alkohol 45. Im Vergleich zu dem Experiment aus Kapitel 7.3.2 konnte aber mit 45 bei keiner hier getesteten Konzentration eine quantitative Umwandlung in Form II beobachtet werden. Die Spaltung beträgt im hier durchgeführten Experiment bei der höchsten Konzentration von 45 noch 49 %.



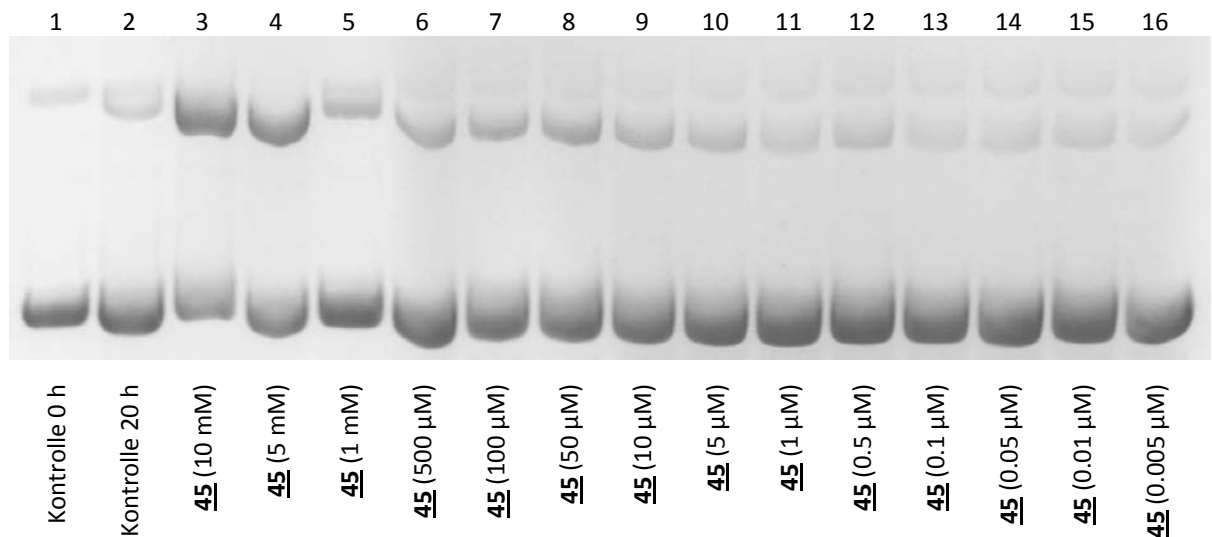
**Abbildung 7-15:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die mit 45 inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-Form (Form II), unten supercoiled-Form (Form I).

Bei den niedrigeren Konzentrationen von 45 wurden die hohen Werte für die Umwandlung in Form II nicht mehr erreicht. Die Spaltmenge nimmt unterhalb von 5 mM stark ab, womit diese Daten in etwa in der gleichen Größenordnung liegen, wie die Werte aus den Vorgängerarbeiten.

Bei der Bestimmung einer Minimal-Konzentration für eine signifikante Spaltmenge eine exakte Grenze zu ziehen fällt schwer, da die Spaltung in der Kontrolle (Lane 2) schon 15.6 % beträgt, und dieser Wert höher ist, als die Gesamtumwandlung in den Lanes 12 und 14-17.

Um die oben erhaltenen Daten besser bewerten zu können, wurde das Experiment wiederholt, wobei diesmal der Wert der Kontrolle nach 20 h von besonderem Interesse war (siehe hierzu *Abbildung 7-16*). Schon bei einer ersten Betrachtung fällt auf, dass wie zuvor keine quantitative Spaltung erreicht werden konnte. Diese Beobachtung bestätigt jedoch die bekannten Werte aus dem vorangegangenen Experiment und sind damit konsistent.





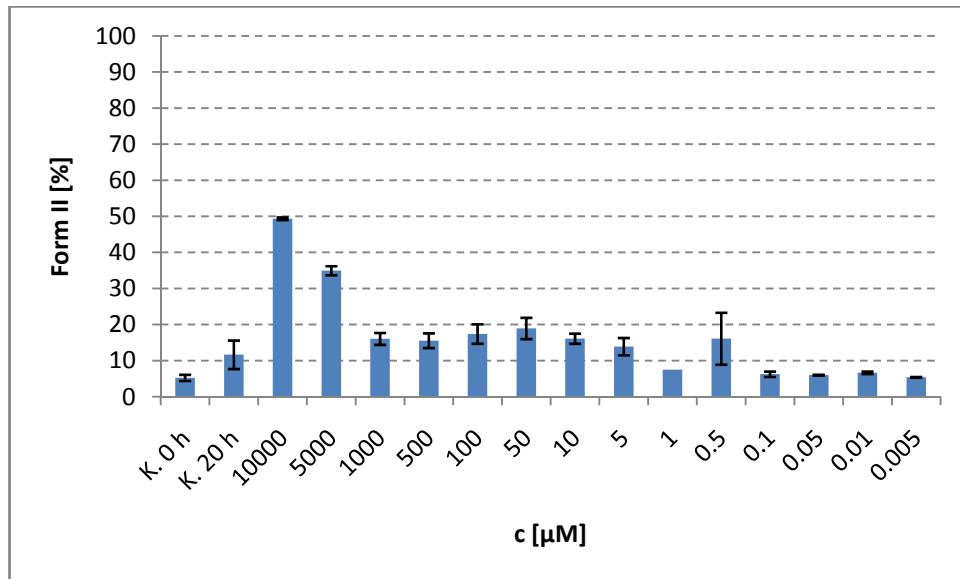
**Abbildung 7-16:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die mit absteigenden Konzentrationen von **45** inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-Form (Form II), unten supercoiled-Form (Form I).

Die ermittelten Werte für die verschiedenen Konzentrationen von **45** sind in *Tabelle 7-3* aufgelistet, zusammen mit den berechneten Durchschnittswerten und den dazugehörigen Standardabweichung:

**Tabelle 7-3:** Übersicht über die experimentell ermittelten Spaltmengen, die errechneten Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

$c [\mu\text{M}]$	1. Exp. [%]	2. Exp. [%]	$\bar{x}$ [%]	$\sigma$ [%]
Kontrolle 0 h	4.4	6.1	5.3	0.8
Kontrolle 20 h	15.6	7.7	11.7	4.0
10000	49.0	49.7	49.4	0.3
5000	33.7	36.2	35.0	1.3
1000	17.7	14.4	16.1	1.6
500	17.6	13.5	15.6	2.1
100	20.1	14.7	17.4	2.7
50	21.9	16.0	19.0	3.0
10	17.5	14.7	16.1	1.4
5	16.3	11.5	13.9	2.4
1	7.5	7.5	7.5	0.0
0.5	23.3	8.9	16.1	7.2
0.1	7.0	5.5	6.3	0.8
0.05	5.9	6.1	6.0	0.1
0.01	7.0	6.3	6.7	0.3
0.005	5.5	5.3	5.4	0.1

Diese Werte sind dann grafisch aufgetragen worden, wobei die *Abbildung 7-17* auch die berechnete Standardabweichung enthält:



**Abbildung 7-17:** Darstellung der errechneten Mittelwerte aus *Tabelle 7-3*. Die schwarzen Indikatoren stehen für die Standardabweichung  $\sigma$ .

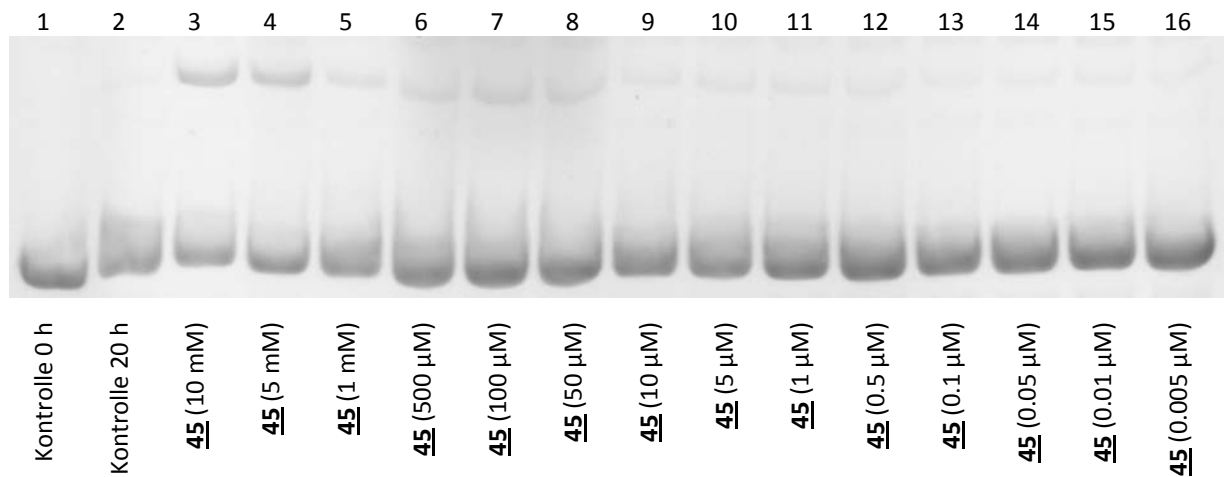
Aus der Grafik kann man ablesen, dass eine signifikante Spaltung durch **45** ab Konzentrationen  $\geq 5$  mM auftritt. Unterhalb dieser Grenze kann man durch die vorhandene Hintergrund-Reaktion nicht mehr von Signifikanz reden.

Auffällig ist bei diesen Experimenten, dass die Ergebnisse teilweise ca. 50 % besser sind, als in der Vergangenheit für **36** ermittelt wurde. Dieser Unterschied in der Spalt-Effizienz ist durch den vorhandenen Ester von **45** nicht zu erklären. Eine mögliche Ursache für die beobachtete Differenz wäre das Auftreten der sehr aktiven Verbindung **94** im hier durchgeführten Experiment.

**94** bildet sich generell recht leicht durch die Hydrolyse des Esters von **45**, könnte somit während den Spalt-Experimenten gebildet, aber ebenso schon während der Synthese von **45** entstanden und über diesen Weg als Kontamination in das vorliegende Experiment eingebracht worden sein (siehe hierzu auch Kapitel 7.3.3.6.)

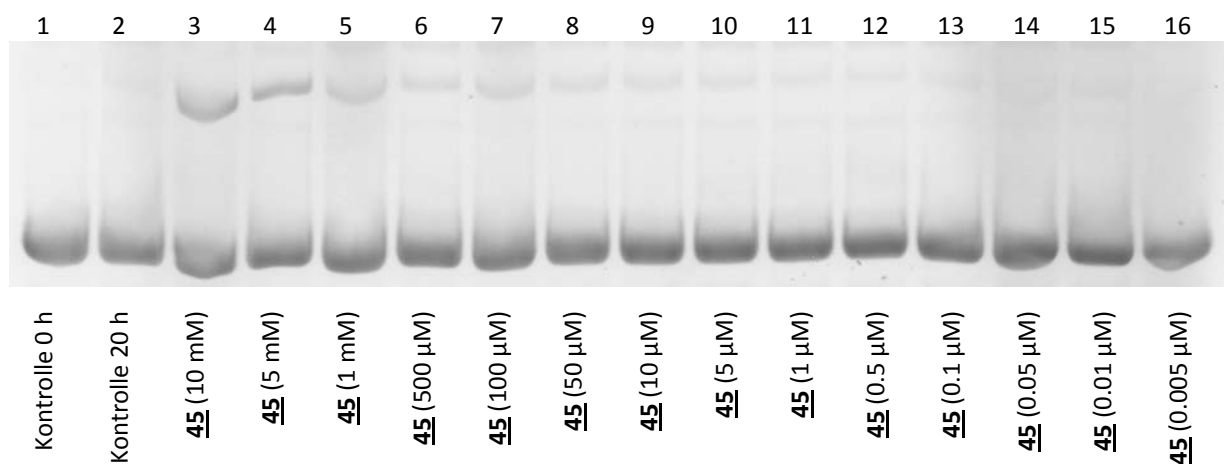
Da die verwendete Charge von **45** nicht auf Abwesenheit von **94** geprüft wurde, ist das Experiment mit einer neuen Charge von **45** wiederholt worden, die sicher frei von **94** ist.

Wie bisher wurde die Plasmid-Spaltung bei Standard-Bedingungen durchgeführt. Die *Abbildung 7-18* zeigt ein Foto der Gel-Elektrophorese dieser Testreihe, die mit einer neuen Charge des Spalters **45** durchgeführt wurde. Wie der *Abbildung* zu entnehmen ist, wurde der gleiche Konzentrationsbereich wie auch zuvor vermessen. Aber auch eine rein qualitative Betrachtung lässt schon erahnen, dass die Mengen der Form II-DNA bei diesem Experiment nicht ganz so hoch sein werden.



**Abbildung 7-18:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die mit einer neuen Charge 45 inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-Form (Form II), unten supercoiled-Form (Form I).

Dieses letzte Experiment ist als Doppelbestimmung durchgeführt worden und liefert daher zwei Datensätze. So ist in *Abbildung 7-19* ein Bild der zweiten Gel-Elektrophorese gezeigt. Wieder kann man schon bei rein oberflächlicher Betrachtung abschätzen, dass die Spaltung hier in derselben Größenordnung liegen sollte wie in *Abbildung 7-18*.



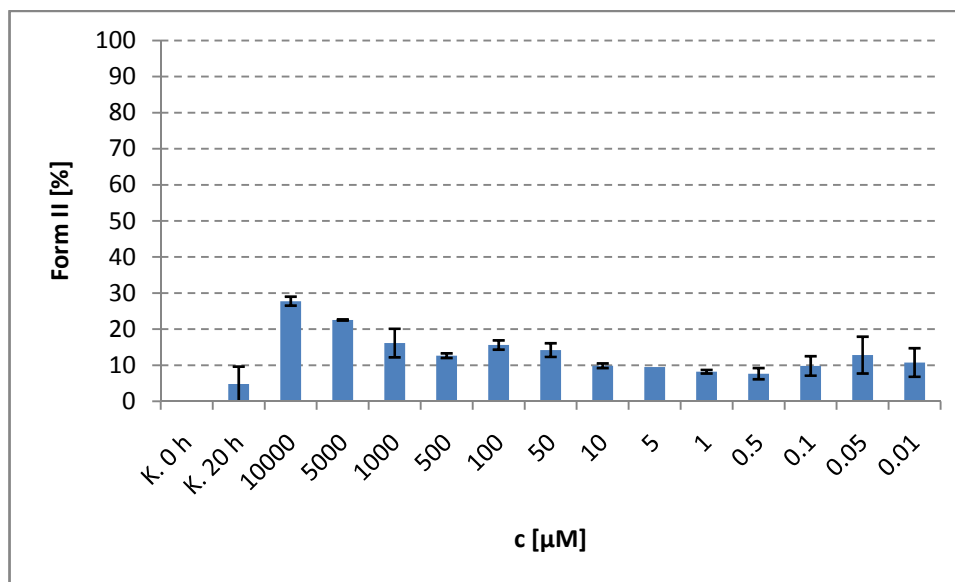
**Abbildung 7-19:** Agarose-Gel (Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die ebenfalls mit der neuen Charge 45 inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-Form (Form II), unten supercoiled-Form (Form I).

Die beiden Analysen wurden elektronisch ausgewertet und sind zusammen mit dem berechneten Mittelwert und der Standardabweichung in *Tabelle 7-4* aufgelistet. Im Vergleich zu *Tabelle 7-3* wurden hier deutlich niedrigere Werte erhalten, die aber umso mehr den Daten aus der Vorgängerarbeit<sup>[47]</sup> ähneln:

**Tabelle 7-4:** Übersicht über die experimentell ermittelten Spaltmengen, die errechneten Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

$c [\mu\text{M}]$	1. Spaltung [%]	2. Spaltung [%]	$\bar{x}$ [%]	$\sigma$ [%]
Kontrolle 0 h	0.0	0.0	0.0	0.0
Kontrolle 20 h	0.0	9.6	4.8	4.8
10000	29.0	26.5	27.8	1.3
5000	22.4	22.7	22.6	0.2
1000	20.1	12.2	16.2	4.0
500	13.3	12.0	12.7	0.6
100	14.3	16.9	15.6	1.3
50	12.3	16.1	14.2	1.9
10	10.5	9.2	9.9	0.7
5	9.5	9.5	9.5	0.0
1	8.7	7.7	8.2	0.5
0.5	9.2	6.1	7.7	1.6
0.1	12.5	7.1	9.8	2.7
0.05	17.9	7.7	12.8	5.1
0.01	14.7	6.8	10.8	4.0

Aus der grafischen Darstellung in *Abbildung 7-20* kann man jetzt ablesen, dass wie schon zuvor eine signifikante Spaltung durch 45 bei Konzentrationen  $\geq 5$  mM von auftritt.



**Abbildung 7-20:** Darstellung der errechneten Mittelwerte aus *Tabelle 7-4*. Die schwarzen Indikatoren stehen für die Standardabweichung  $\sigma$ .

Der Unterschied in der Aktivität zwischen den beiden Experiment-Reihen (vgl. *Tabelle 7-3* und *Tabelle 7-4*) scheint tatsächlich durch eingeschleppte Verunreinigungen durch die Carbonsäure 94 verursacht worden zu sein.

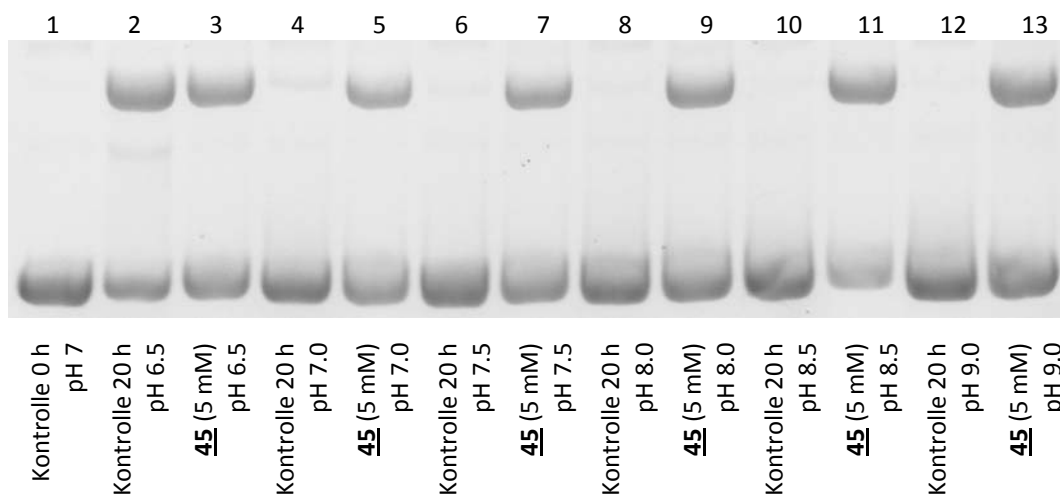
### 7.3.3.1 pH-Abhängigkeit der Plasmid-Spaltung

Ein interessanter Aspekt im Bezug auf die Reaktivität von DNA-Spaltern wie **45** ist die Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert. Je nachdem, ob man den pH ins Saure oder Basische verschiebt, indem man einen geeigneten Puffer verwendet, sollte sich die Spalt-Aktivität verändern, da sich der Protonierungsgrad des Reagenzes evtl. verändert.

Man muss bei diesen Experimenten bedenken, dass sich der pH selbstverständlich nicht nur auf z.B. **45** auswirkt, sondern ebenso die verwendete DNA beeinflusst. Es ist dabei zu berücksichtigen, dass man im Säuren Depurinierung induzieren kann, die zu einer ausgeprägten Hintergrundreaktion führt, und damit die Ergebnisse verfälscht.

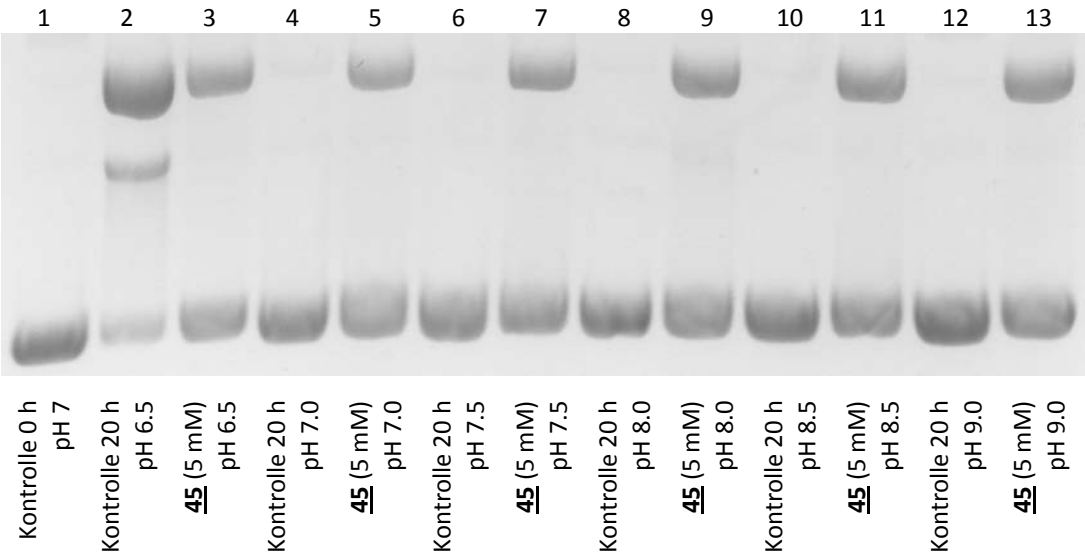
Ein erster Vorversuch ist in *Abbildung 7-21* zu sehen. Dort wurde **45** bei unterschiedlichem pH mit pUC19-Plasmid inkubiert (der HEPES-Puffer wurde mit NaOH oder HCl auf den entsprechenden pH eingestellt; die sonstigen Bedingungen blieben unverändert).

Bei Betrachtung der Kontroll-Lane 2 fällt sofort auf, dass bei pH 6.5 schon eine beträchtliche Menge von supercoiled Plasmid in die nicked-Form überführt wurde; ein Effekt, dessen Ausmaß bei diesem milden sauren pH nicht erwartet wurde. In den anderen Kontrollen ist kaum open-circle DNA zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass der beobachtete Spalt-Effekt bei höheren pH-Werten vom Molekül **45** kommen muss.



**Abbildung 7-21:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die bei verschiedenen pH-Werten mit **45** inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-Form (Form II), unten supercoiled-Form (Form I). In Lane 2 ist bei pH 6 eine schwache Bande der linearen DNA (Form III) zu erkennen.

Zur Absicherung der Daten ist das pH-abhängige Experiment nochmals wiederholt und analysiert worden und ist in *Abbildung 7-22* dargestellt. Diese neuerliche Testreihe bestätigt sehr gut die bisher gewonnenen Erkenntnisse, denn auch hier gibt es wieder bei pH-Werten von 7 bis 9 annähernd konstante Spaltwerte, wobei sich bei pH 6.5 erneut eine sehr große Hintergrundreaktion zeigt.



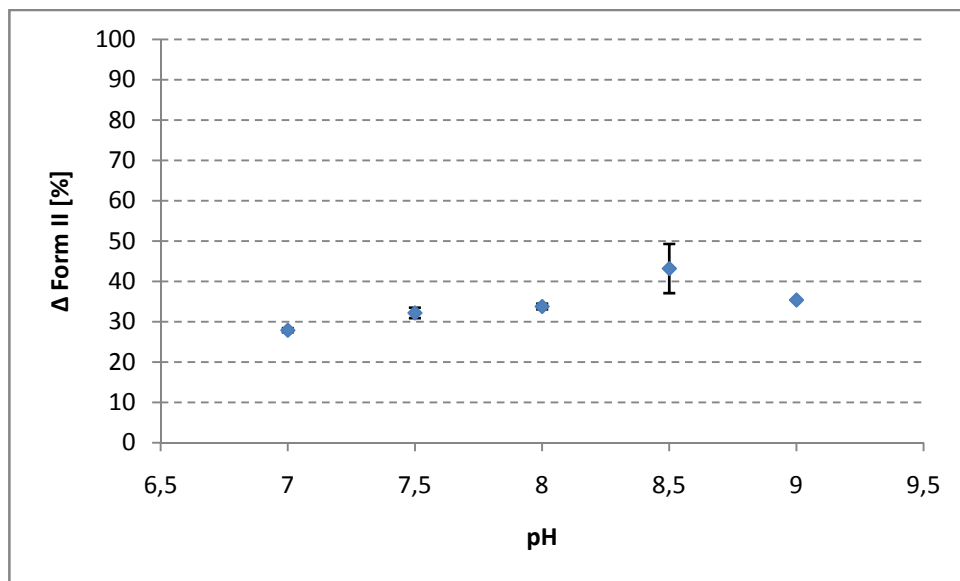
**Abbildung 7-22:** Agarose-Gel (Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die bei verschiedenen pH-Werten mit 45 inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-Form (Form II), unten supercoiled-Form (Form I). Die Bande für lineare DNA in Lane 2 tritt im Vergleich zu *Abbildung 7-21* in der Reproduktion deutlicher hervor.

Die elektronische Auswertung der beiden Experimente ist in *Tabelle 7-5* dargestellt:

**Tabelle 7-5:** Übersicht über die experimentell ermittelten Spaltmengen, die errechneten Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

pH	1. Exp. [%]	2. Exp. [%]	$\bar{x}$ [%]	$\sigma$ [%]
6.5	nicht auswertbar	nicht auswertbar	-	-
7.0	28.4	27.4	27.9	0.5
7.5	30.9	33.5	32.2	1.3
8.0	33.1	34.5	33.8	0.7
8.5	49.3	37.1	43.2	6.1
9.0	35.4	35.4	35.4	0.0

Zur übersichtlicheren Darstellung ist aus den Mittelwerten eine Grafik erstellt worden, die in *Abbildung 7-23* gezeigt ist:



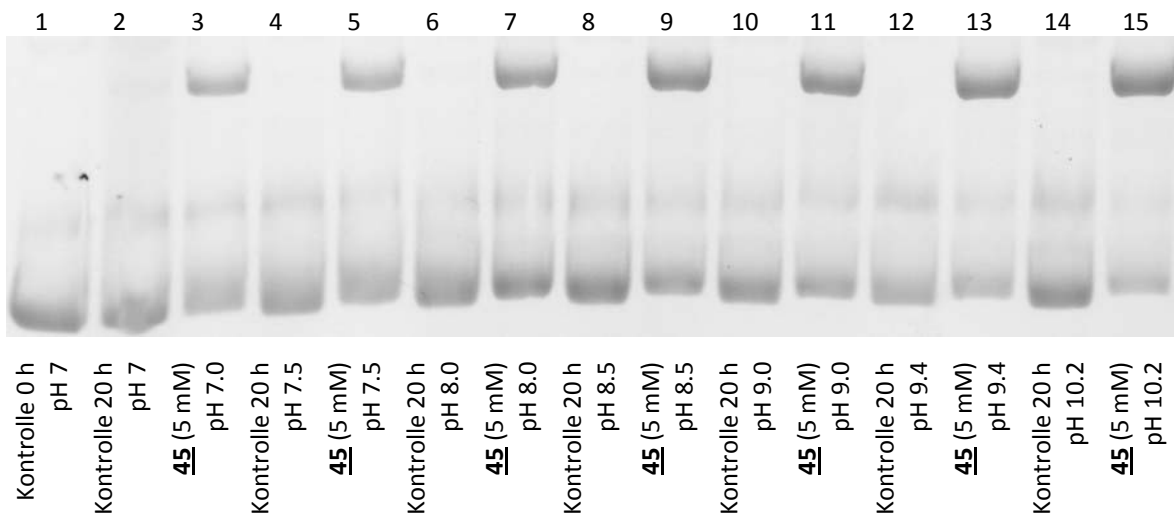
**Abbildung 7-23:** Graphische Darstellung der Ergebnisse aus *Tabelle 7-5*. Die Aktivität von **45** bleibt ab einem pH von 7 bis pH 9 annähernd konstant. Für den sauren Bereich lässt sich keine sichere Aussage über **45** treffen, da hier die DNA durch die Säure stark abgebaut wird.

Anders als bei pH 6.5 konnten für den Bereich zwischen 7 und 9 reproduzierbare Daten mit nur geringer Streuung erhalten werden. Die Menge der gebildeten open-circle-DNA bleibt über den gesamten Bereich in etwa konstant, sodass man annehmen kann, dass die pH-Änderung keinen Einfluss auf die Spaltaktivität hat.

Bei den hier getesteten pH-Werten kann man davon ausgehen, dass die sehr basische Guanidin-Gruppe von **45** immer noch komplett protoniert vorliegt. Um zu testen, ob die Aktivität dieses Bisguanidinium-Alkohols bei noch höherem pH wieder schwindet, wurde die pH-Testreihe um die Werte 9.4 und 10.2 erweitert<sup>[XIII]</sup>, und auf Werte kleiner 7 verzichtet.

Wie man der *Abbildung 7-24* entnehmen kann, ist noch bis zu einem pH von 10.2 ein deutlicher Spalteffekt zu erkennen, während die Menge der nicked-DNA in den Kontrollen sehr gering bleibt.

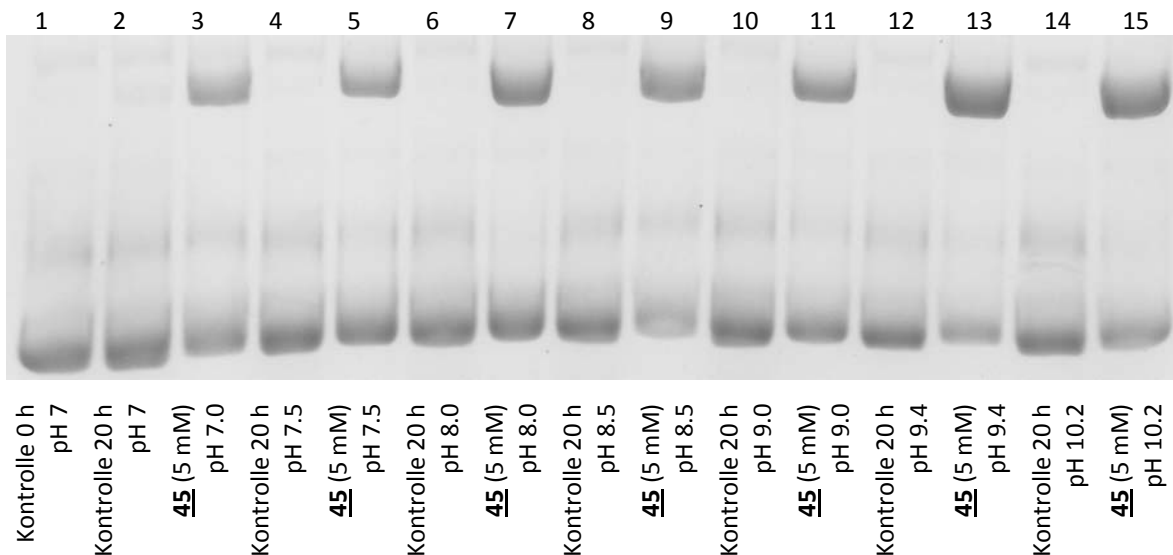
<sup>XIII</sup> Da bekannt ist, dass DNA ab einem pH von ~ 11.6 denaturiert, wurden keine höheren pH-Werte als 10.2 in diesen Experimenten getestet



**Abbildung 7-24:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die bei verschiedenen pH-Werten mit 45 inkubiert wurde. Hier ist ein pH-Bereich von 7 bis 10.2 untersucht worden. Oben im Bild: open-circle-Form (Form II), unten supercoiled-Form (Form I).

Die qualitative Auswertung des Gels lässt hier auf eine Bestätigung der aus den Vorversuchen erhaltenen Werte schließen, wobei aber auch bei den beiden neu hinzugekommenen pH-Werten in den Lanes 12 bis 15 eine größere Menge Form II-DNA zu erkennen ist.

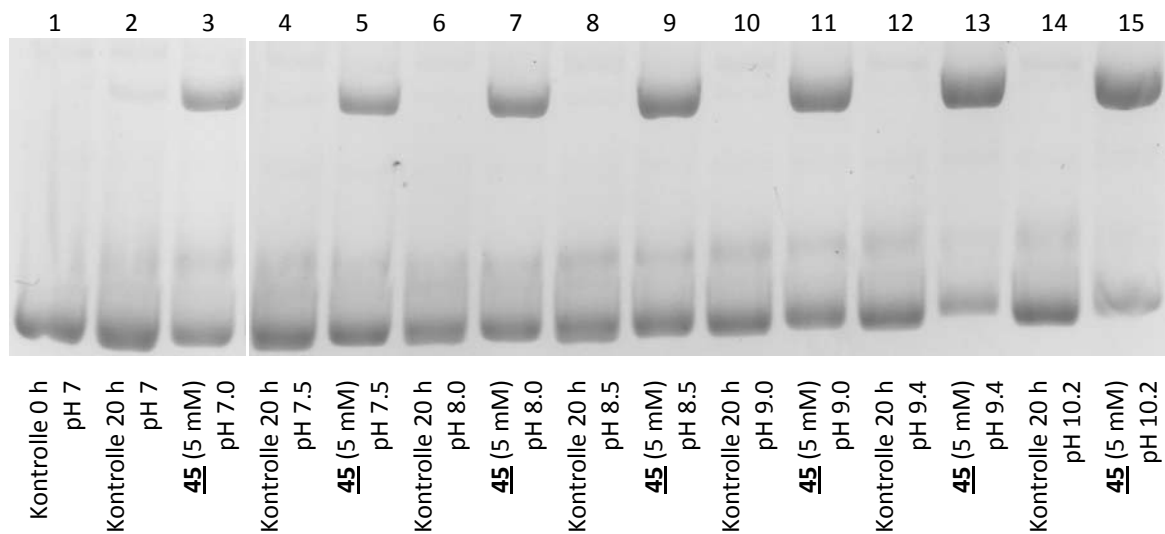
Das gesamte Experiment ist noch zweimal unter den gleichen Bedingungen reproduziert worden und im Folgenden abgebildet.



**Abbildung 7-25:** Agarose-Gel (Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die bei verschiedenen pH-Werten mit 45 inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-Form (Form II), unten supercoiled-Form (Form I).



Keine der beiden Reproduktionen in *Abbildung 7-25* und *Abbildung 7-26* weist Unterschiede zu *Abbildung 7-24* auf, was auf eine hohe Konsistenz der Daten schließen lässt.



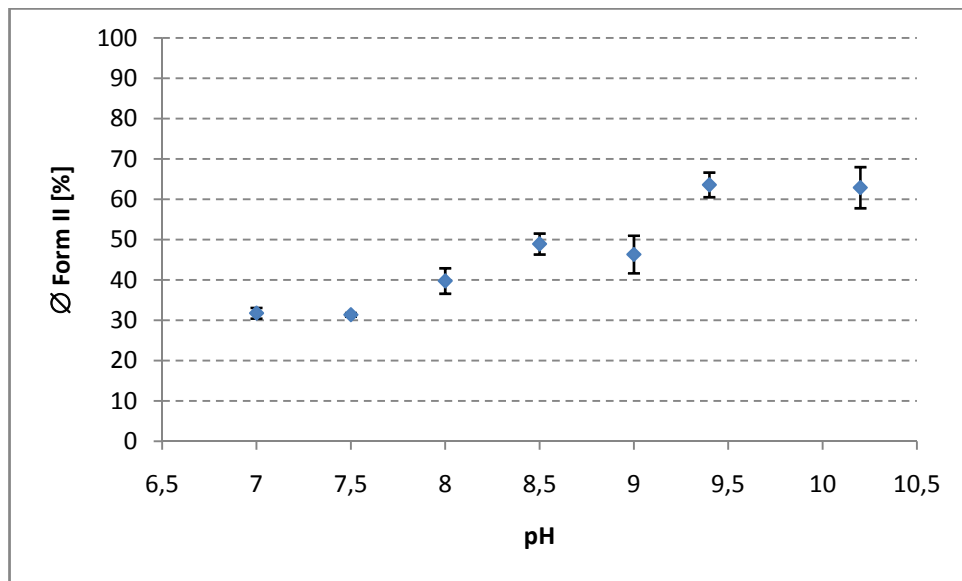
**Abbildung 7-26:** Agarose-Gel (zweite Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die bei verschiedenen pH-Werten mit 45 inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

Aus den drei Experimenten sind für jeden pH-Wert Mittelwert und Standardabweichung errechnet worden und in *Tabelle 7-6* aufgelistet:

**Tabelle 7-6:** Übersicht über die experimentell ermittelten Spaltmengen, die errechneten Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

pH	Exp. 1 [%]	Exp. 2 [%]	Exp. 3 [%]	$\bar{x}$ [%]	$\sigma$ [%]
7.0	32.1	33.2	30.0	31.8	1.3
7.5	31.0	32.0	31.1	31.4	0.4
8.0	35.3	41.9	42.1	39.8	3.2
8.5	49.8	51.6	45.4	48.9	2.6
9.0	50.4	39.8	48.8	46.3	4.7
9.4	59.3	65.4	66.1	63.6	3.1
10.2	67.5	55.8	65.4	62.9	5.1

Aus diesen Werten ergibt sich dann der folgende Verlauf in *Abbildung 7-27*, in dem die Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben ist:



**Abbildung 7-27:** Graphische Darstellung der errechneten Mittelwerte (aus 3 Experimenten) der pH-abhängigen Spaltaktivität von **45**. Als schwarze Fehlerbalken ist die Standardabweichung mit eingetragen.

Das Experiment hat gezeigt, dass der Bisguanidinium-Alkohol **45** bei pH 7,0 bis 7,5 die geringste Spaltung induziert, und dass die Menge der gebildeten open-circle-DNA mit steigendem pH ebenso ansteigt. Der Anstieg der gebildeten Form II-DNA mit zunehmendem pH kann durch die Bildung des Moleküls **94** während der Inkubation erklärt werden, denn es wurde eine relativ leichte Esterhydrolyse bei Spalter **45** beobachtet.

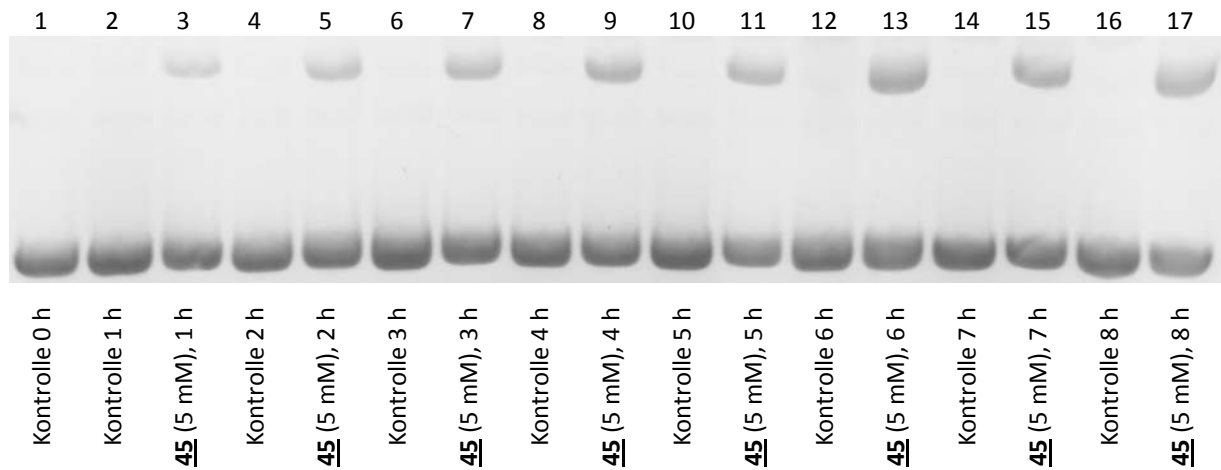
Über den gesamten hier untersuchten pH-Bereich konnte kein Wert gefunden werden, bei dem die Menge der gebildeten Form II-DNA stark vermindert wird und man daher von deprotonierten Guanidin-Gruppen bei **45** ausgehen könnte (vgl. Kapitel 7.3.5.1).

### 7.3.3.2 Kurzzeit-Kinetik

Als nächstes sollte die Zeitabhängigkeit der Plasmid-Spaltung durch den Bisguanidinium-Alkohol **45** untersucht werden, wobei für diese Kurzzeit-Kinetik ein Zeitraum von acht Stunden gewählt wurde. Die Experimente sollten aber in Anbetracht der Ergebnisse aus Kapitel 7.3.3.1 bei zwei verschiedenen pH-Werten -namentlich 8,5 und 9,4- durchgeführt werden.

Für die Kinetik-Messungen wurde pUC19-Plasmid-DNA wieder unter den üblichen Bedingungen bei einem der genannten pH-Werte für acht Stunden mit **45** inkubiert, wobei stündlich eine Probe (sowohl für die Hintergrund-Reaktion als auch für die Spaltung) entnommen wurde.

Die *Abbildung 7-28* zeigt die elektrophoretische Analytik der Kurzzeit-Kinetik bei pH 8.5. Auf den ersten Blick sieht man eine ansteigende Menge der open-circle-DNA mit zunehmender Zeit, während in dem untersuchten Zeitraum nahezu keine Hintergrund-Reaktion stattfindet.



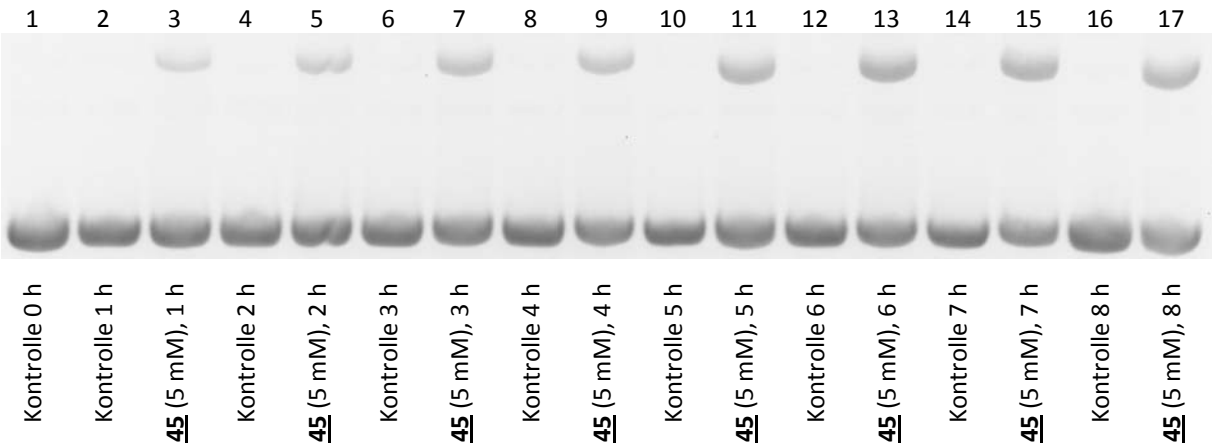
**Abbildung 7-28:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die mit 45 inkubiert wurde (pH 8.5). Im Abstand von je einer Stunde wurde eine Probe entnommen, um eine Kurzzeit-Kinetik erstellen zu können. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

Die Quantifizierung in *Tabelle 7-7* zeigt für die ersten 6 Stunden eine stetige Zunahme der nicked-Form, wobei der Zuwachs der open-circle-DNA nicht proportional zur vergangenen Zeit ist, sondern sich mit zunehmender Reaktionszeit abschwächt.

**Tabelle 7-7:** Quantifizierung der zeitabhängigen Umwandlung von supercoiled Plasmid-DNA in open-circle-DNA (oc). In der Spalte „ $\Delta$ “ ist die Differenz von Kontrolle und der entsprechenden mit 45 inkubierten Probe eingetragen.

$t$ [h]	Lane	Molekül	oc [%]	Lane	Molekül	oc [%]	$\Delta$ [%]
0	1	Kontrolle	0.1				
1	2	Kontrolle	0.4	3	<u>45</u> (5 mM)	9.2	8.8
2	4	Kontrolle	0.0	5	<u>45</u> (5 mM)	13.5	13.5
3	6	Kontrolle	0.1	7	<u>45</u> (5 mM)	17.3	17.2
4	8	Kontrolle	0.1	9	<u>45</u> (5 mM)	20.3	20.2
5	10	Kontrolle	0.5	11	<u>45</u> (5 mM)	21.2	20.7
6	12	Kontrolle	0.1	13	<u>45</u> (5 mM)	27.3	27.2
7	14	Kontrolle	0.3	15	<u>45</u> (5 mM)	23.3	23.0
8	16	Kontrolle	0.0	17	<u>45</u> (5 mM)	27.2	27.2

In *Abbildung 7-29* ist die gelelektrophoretische Analytik der Kinetik dargestellt, die bei pH 9.4 durchgeführt wurde. Wie zuvor ist auch hier keine sichtbare Hintergrund-Reaktion vorhanden, und die Menge der open-circle-DNA steigt mit zunehmender Zeit an.



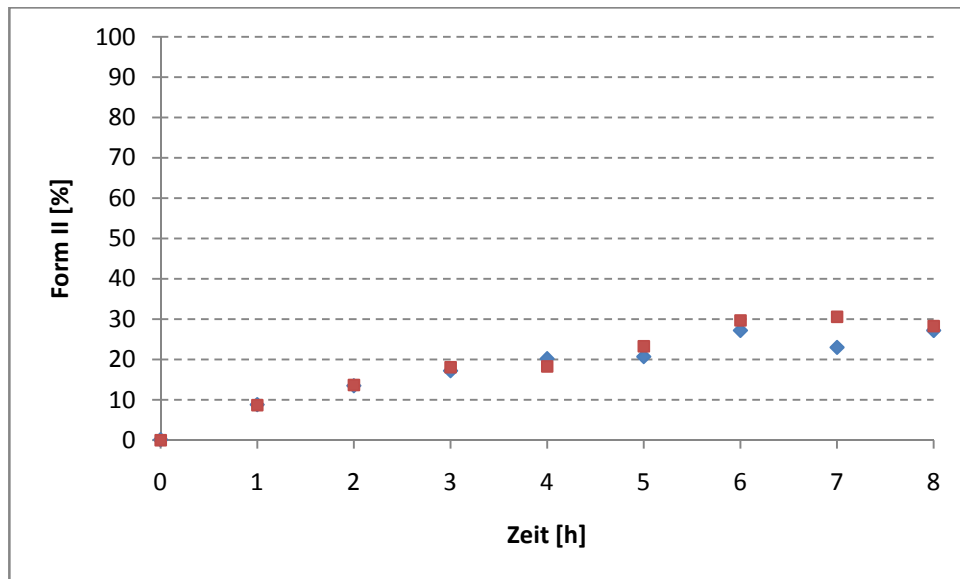
**Abbildung 7-29:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die mit 45 inkubiert wurde (pH 9.4). Im Abstand von je einer Stunde wurde eine Probe entnommen, um eine Kurzzeit-Kinetik erstellen zu können. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

Die aus der elektronischen Prozessierung gewonnen Daten sind in *Tabelle 7-8* aufgelistet, und bestätigen den Eindruck der ersten Betrachtung. Die erreichte Menge an open-circle-DNA liegt nach 8 h auf demselben Niveau wie bei pH 8.5.

**Tabelle 7-8:** Quantifizierung der zeitabhängigen Umwandlung von supercoiled Plasmid-DNA in open-circle-DNA (oc). In der Spalte „Δ“ ist die Differenz von Kontrolle und der entsprechenden mit 45 inkubierten Probe eingetragen.

t [h]	Lane	Molekül	oc [%]	Lane	Molekül	oc [%]	Δ [%]
0	1	Kontrolle	0.0				
1	2	Kontrolle	0.1	3	<u>45</u> (5 mM)	8.8	8.7
2	4	Kontrolle	0.1	5	<u>45</u> (5 mM)	13.8	13.7
3	6	Kontrolle	0.3	7	<u>45</u> (5 mM)	18.4	18.1
4	8	Kontrolle	0.1	9	<u>45</u> (5 mM)	18.4	18.3
5	10	Kontrolle	0.1	11	<u>45</u> (5 mM)	23.4	23.3
6	12	Kontrolle	0.1	13	<u>45</u> (5 mM)	29.8	29.7
7	14	Kontrolle	0.4	15	<u>45</u> (5 mM)	31.0	30.6
8	16	Kontrolle	0.3	17	<u>45</u> (5 mM)	28.6	28.3

Um besser beurteilen zu können, in wie fern sich die beiden Kinetiken unterscheiden bzw. welchen Einfluss der pH-Unterschied hat, wurden beide Experimente nochmals als Graph dargestellt und in *Abbildung 7-30* übereinander gelegt. Es ist ersichtlich, dass es keinen nennenswerten Unterschied der beiden Kinetiken gibt, weder was die Reaktionsgeschwindigkeit noch die finale Spaltmenge angeht.



**Abbildung 7-30:** Grafische Überlagerung der beiden durchgeführten Kurzzeit-Kinetiken (blaue Rauten: pH 8.5, rote Quadrate: pH 9.4). Man erkennt bis auf kleine Schwankungen eine gute Übereinstimmung der beiden Kurven.

### 7.3.3.3 Einfluss von Sauerstoff auf die Spaltung

Eine zentrale Fragestellung betrifft den generellen Modus der Spaltung von DNA: Beruht die Spaltung durch **45** auf einem oxidativen Mechanismus, in den Sauerstoff involviert ist?

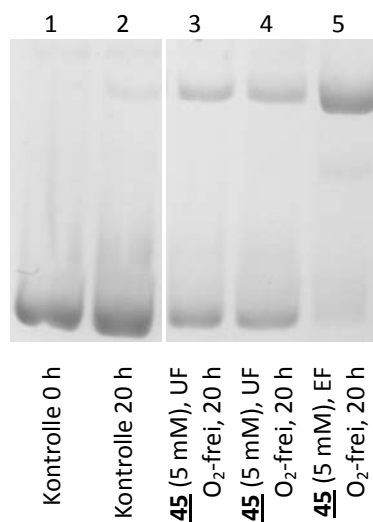
Um dies zu klären, wurden die üblichen Spalt-Experimente diesmal u.a. unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt. Sollte der Mechanismus auf der Anwesenheit von Sauerstoff beruhen, dürfte sich dementsprechend unter Sauerstoff-freien Bedingungen keine Umwandlung von supercoiled DNA in open-circle-DNA nachweisen lassen, die deutlich größer wäre als die normal ablaufende Hintergrund-Reaktion. Spielt O<sub>2</sub> jedoch bei der Spaltung keine Rolle, so wird sich die Abwesenheit des Oxidans nicht auf die Spaltung auswirken.

In einem ersten Experiment wurde wieder pUC19 und 5 mM **45** unter den Standard-Bedingungen, jedoch unter Ausschluss von Sauerstoff in einem durch Abschmelzen versiegelten NMR-Rohr inkubiert<sup>[XIV]</sup>. Als Kontrolle wurde **45** dazu unter Normalbedingungen und Anwesenheit von O<sub>2</sub> inkubiert. Allerdings ließ sich bei der anschließenden Analytik (nicht abgebildet) keinerlei DNA mehr nachweisen. Die Vermutung war hier, dass die eingesetzte DNA zum größten Teil an das Glas adsorbiert war, und so der Analytik nicht zur Verfügung stand.

<sup>XIV</sup> Das NMR-Rohr wurde zunächst in einem Autoklaven sterilisiert, dann mit der entsprechenden Lösung befüllt und mehrfach entgast, indem die Lösung mit flüssigem Stickstoff eingefroren und unter Vakuum wieder aufgetaut wurde. Die so präparierte Probe wurde dann durch Abschmelzen in dem NMR-Rohr versiegelt.

Aus dieser Vermutung heraus wurde das Experiment unter identischen Parametern wiederholt, wobei diesmal aber das autoklavierte NMR-Rohr vor dessen Einsatz noch silanisiert wurde, was die Adsorption der DNA an das Glas verhindern sollte.

In der gelelektrophoretischen Analyse (nicht gezeigt) dieses Experiments waren die Banden für die O<sub>2</sub>-freie Inkubation nur sehr schwach zu sehen. Um die Banden besser sichtbar zu machen und damit eine verlässlichere Quantifizierung zu erhalten, sind 2 unterschiedliche Methoden angewandt worden, um die DNA in der Probe aufzukonzentrieren: Ultrafiltration (UF) und EtOH-Fällung (EF). Mit den so aufkonzentrierten Proben ist eine neuerliche Elektrophorese durchgeführt worden, die in *Abbildung 7-31* zu sehen ist. Die Banden sind durch die Prozeduren zur Anreicherung hier viel besser zu sehen.



**Abbildung 7-31:** Agarose-Gel-Elektrophorese der aufkonzentrierten Proben. Zur Konzentration der Proben wurde die Ultrafiltration (UF) und die Ethanolfällung (EF) getestet. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

Man sieht aber auch, dass sich die Lanes 3 und 4 (beide UF) stark von Lane 5 (EF) unterscheiden. Bei zusätzlicher Betrachtung von *Tabelle 7-9* fällt auf, dass die Ethanol-Fällung die Menge der gebildeten open-circle-DNA stark beeinflusst bzw. verfälscht, denn der Wert ändert sich von ~26.6 % auf ~84 %. Die Ethanol-Fällung scheint keine geeignete Methode zur Konzentration der DNA für diese Art von Experiment zu sein.

**Tabelle 7-9:** Quantifizierung der Umwandlung von supercoiled Plasmid-DNA in open-circle-DNA (oc). Hier sind die bereits vorhandenen Proben mit der Ultrafiltration (UF) bzw. der Ethanol-fällung (EF) vorher aufkonzentriert worden.

Lane	Molekül	c [mM]	t [h]	oc [%]
1	Kontrolle	-	0	0.0
2	Kontrolle	-	20	2.8
3	<b>45</b> , O <sub>2</sub> -frei, UF	5	20	26.2
4	<b>45</b> , O <sub>2</sub> -frei, UF	5	20	27.1
5	<b>45</b> , O <sub>2</sub> -frei, EF	5	20	83.9

Im Mittel (Lane 3 und 4) beträgt die Menge an open-circle DNA 26.6 %, was für die hier eingesetzte Konzentration von **45** etwa 10 % höher liegt, als noch zuvor (siehe *Tabelle 7-4*) bestimmt werden konnte. Im Vergleich zu *Tabelle 7-4*, in der die Werte für open-circle DNA unter Normalbedingungen -d.h. mit Sauerstoff- ermittelt wurden, ist der hier erhaltene Wert etwas mehr als 4 % größer und liegt damit in der gleichen Größenordnung, wenn auch eine Ursache dafür in einem leichten Aufkonzentrieren der Probe durch das mehrfache Evakuieren liegen könnte.

Diese ermittelten Werte lassen darauf schließen, dass die Spaltung von supercoiled Plasmid-DNA durch **45** nicht von der Anwesenheit von Sauerstoff abhängig ist. Andernfalls wäre der Spalt-Effekt bei Abwesenheit von O<sub>2</sub> auf das Niveau der Hintergrund-Reaktion abgefallen (sofern der oxidative Mechanismus der einzig vorhandene ist).

#### 7.3.3.4 Einfluss von Metall-Ionen auf die DNA-Spaltung

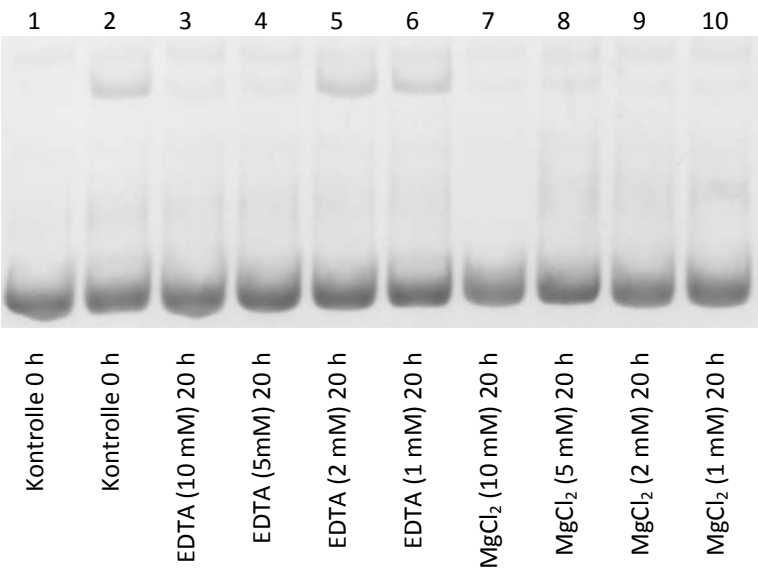
Im Folgenden sollte geprüft werden, ob sich die Menge der durch **45** gebildeten open-circle-DNA in Anwesenheit von EDTA bzw. MgCl<sub>2</sub> ändert.

EDTA wird hinzugegeben um zu testen, ob die beobachteten Spalt-Effekte durch eingeschleppte Hydroxid-bildende Metall-Kationen verursacht wurden. Ist nach Zugabe von EDTA immer noch eine Spaltung zu sehen, kann man davon ausgehen, dass diese Spaltung tatsächlich durch **45** induziert wird.

Durch die Zugabe von Mg<sup>2+</sup> soll untersucht werden, ob sich die Spalt-Effizienz von **45** erhöhen lässt. Steigt die Menge der open-circle-Form bei Zugabe von Mg<sup>2+</sup> an, kann man annehmen, dass die Kationen einen kooperativen Effekt auf die Phosphate ausüben, und eventuell die P-O-Bindungen durch elektrostatische Wechselwirkungen polarisieren.

Zunächst muss ermittelt werden, wie sich die zugegebenen Substanzen im Experiment auswirken bzw. ob man erhöhte Spaltemengen allein durch Zugabe von EDTA bzw. MgCl<sub>2</sub> induzieren kann. Hierzu wurde Plasmid-DNA (jeweils 22.5 nM) mit verschiedenen Konzentrationen von EDTA oder MgCl<sub>2</sub> inkubiert, ohne dabei **45** zuzugeben.

Die Analytik dieses Experimentes, bei dem wieder unter den Standard-Bedingungen inkubiert wurde, ist in *Abbildung 7-32* zu sehen. Man kann bei keiner der Lanes eine besonders herausragende Menge von open-circle-DNA erkennen.



**Abbildung 7-32:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die mit verschiedenen Konzentrationen von EDTA bzw. MgCl<sub>2</sub> inkubiert wurde. Zur Ermittlung des Einflusses dieser Substanzen auf DNA wurde kein anderes Spaltreagenz zugegeben. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

Schaut man sich dann die Werte in *Tabelle 7-10* an, sieht man ebenso keinerlei Effekt. Die bestimmten Werte der open-circle-DNA liegen sogar meist unter dem Wert der Kontrolle in Lane 2.

**Tabelle 7-10:** Quantifizierung der Umwandlung von supercoiled Plasmid-DNA in open-circle-DNA (oc) und lineare DNA. Die Spalte „oc“ enthält hierbei die Summe aus open-circle und linearer DNA.

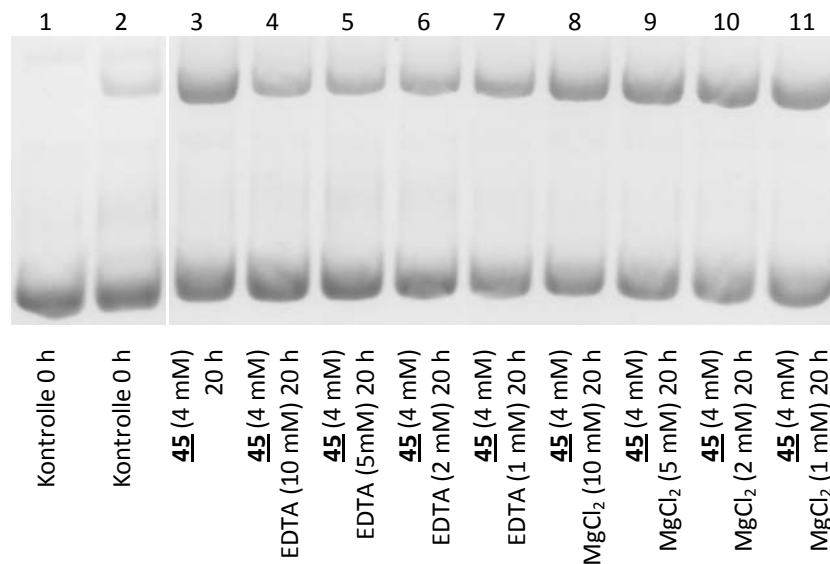
Lane	t [h]	Substanz	oc [%]
1	0	Kontrolle	0.1
2	20	Kontrolle	8.4
3	20	10 mM EDTA	1.8
4	20	5 mM EDTA	1.8
5	20	2 mM EDTA	9.8
6	20	1 mM EDTA	7.4
7	20	10 mM MgCl <sub>2</sub>	1.1
8	20	5 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5
9	20	2 mM MgCl <sub>2</sub>	0.4
10	20	1 mM MgCl <sub>2</sub>	0.7



Man kann aus diesen Werten schließen, dass weder EDTA noch  $\text{MgCl}_2$  einen spaltenden Effekt auf Plasmid-DNA ausüben.

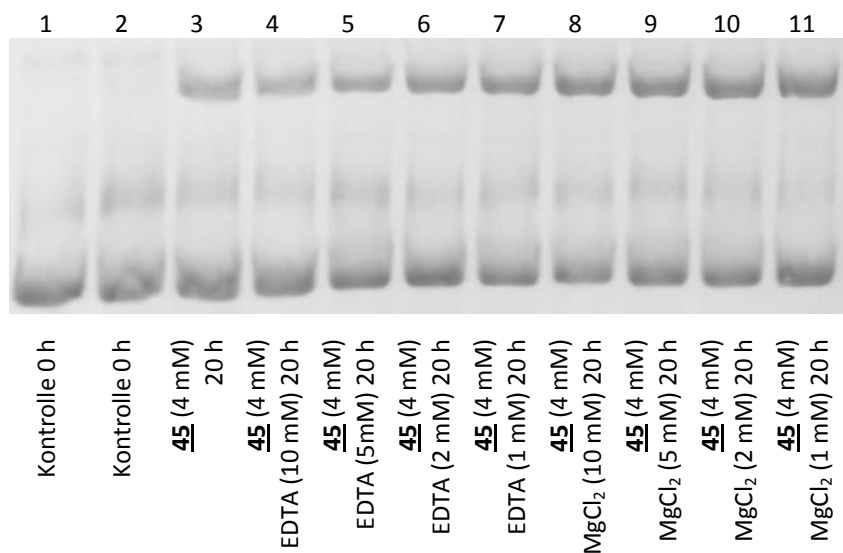
Das obige Experiment wurde dann unter Zugabe von **45** in einer Konzentration von 4 mM mehrfach wiederholt, wobei die bisher verwendeten Bedingungen unverändert blieben.

Die elektrophoretische Analytik in *Abbildung 7-33* zeigt in den Lanes 1 bis 3 Kontrollen, in denen weder EDTA noch  $\text{MgCl}_2$  anwesend ist. In Lane 3 ist **45** vorhanden, um einen Normalwert der Spaltung zu bekommen. Die folgenden 4 Lanes zeigen den Einfluss von EDTA in absteigenden Konzentrationen, und man kann durchaus eine leichte Abnahme der Spaltung bei hohen Konzentrationen von EDTA beobachten. Die letzten 4 Lanes zeigen die Inkubation mit **45** und  $\text{MgCl}_2$ , wobei aber augenscheinlich kein Unterschied zur Kontrolle in Lane 3 festzustellen ist.



**Abbildung 7-33:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von EDTA bzw.  $\text{MgCl}_2$  mit **45** inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

Die *Abbildung 7-34* zeigt die Analytik einer weiteren Testreihe, die durchaus Ähnlichkeiten zu *Abbildung 7-33* aufweist:



**Abbildung 7-34:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die unter Zusatz von EDTA bzw. MgCl<sub>2</sub> mit **45** inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

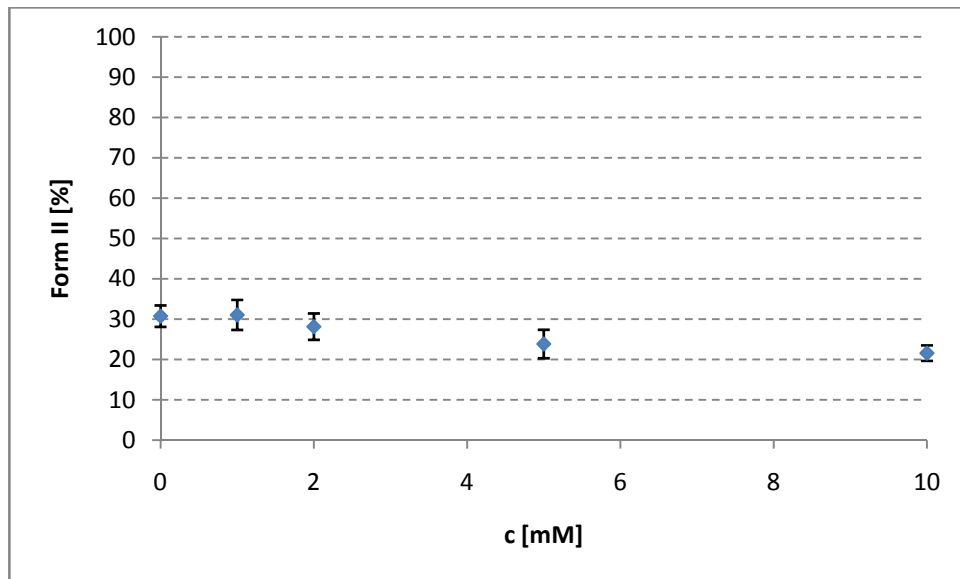
Zum direkten Vergleich sind die jeweiligen Experimente für (zunächst für EDTA) wieder ausgewertet und in *Tabelle 7-11* übersichtlich dargestellt. Zusätzlich wurde noch der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet:

**Tabelle 7-11:** Übersicht über die experimentell ermittelten Spaltmengen für die Inkubation mit EDTA. Angegeben sind ebenso die errechneten Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

EDTA [mM]	Exp. 1 [%]	Exp. 2 [%]	Exp. 3 [%]	$\bar{x}$ [%]	$\sigma$ [%]
0	32.4	32.9	27.0	30.8	2.7
1	26.7	30.7	35.8	31.1	3.7
2	27.4	24.6	32.5	28.2	3.3
5	22.5	20.4	28.7	23.9	3.5
10	21.5	19.3	24.0	21.6	1.9

Aus dem Mittelwert und der Standardabweichung ist eine Grafik erstellt worden, die in *Abbildung 7-35* gezeigt ist und den allgemeinen Trend verdeutlicht. Es ist ersichtlich, dass es keine signifikante Verminderung in der Menge der open-circle-DNA gibt. Darüberhinaus lässt sich sagen, dass der beobachtete Spalt-Effekt nicht auf Kontaminationen durch Metall-Kationen beruhen kann, denn in diesem Fall hätte die Spaltmenge bereits bei Zugabe von 1 mM EDTA stark abnehmen müssen.

Das tendenziell leichte Absinken der Spaltmenge mit zunehmender Konzentration von EDTA kann durch die Bildung von Ionenpaaren zwischen EDTA und **45** verursacht worden sein, wenn so der zugegebene, negativ geladene Chelator die elektrostatische Attraktion der Guanidinium-Gruppen an die Phosphate der DNA behindert.



**Abbildung 7-35:** Grafische Darstellung des Mittelwertes und der Standardabweichung der EDTA-abhängigen Spaltexperimente von 4 mM **45** mit pUC19-Plasmid-DNA. Die Menge der open-circle-Form nimmt mit zunehmender EDTA-Konzentration tendenziell ab.

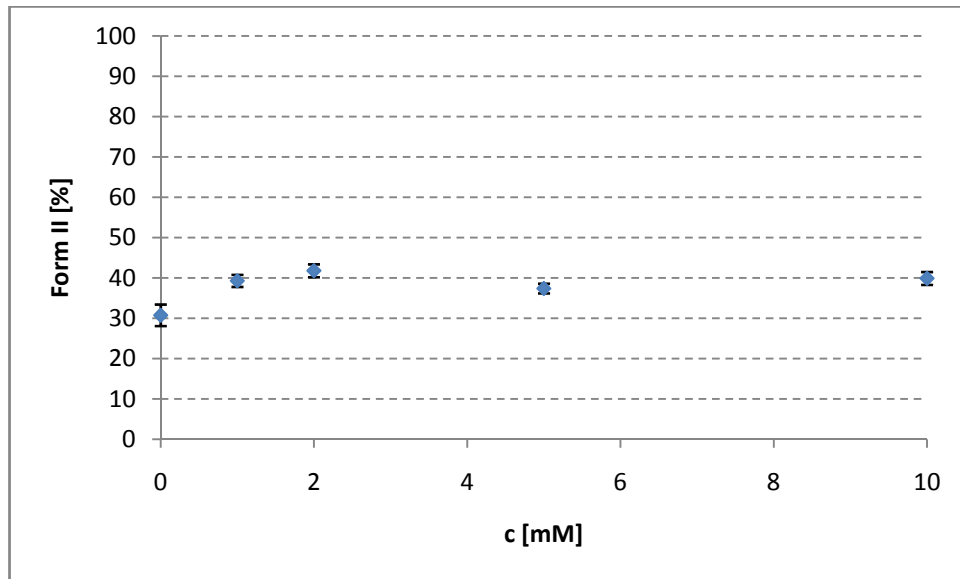
Eine äquivalente Zusammenstellung für die Experimente mit  $\text{MgCl}_2$  ist in *Tabelle 7-12* aufgelistet. Auch in diesem Fall sind wieder Mittelwert und Standardabweichung berechnet worden, wobei die Daten aus Experiment 1 aber nicht berücksichtigt wurden, da diese offensichtliche Ausreisser darstellen.

**Tabelle 7-12:** Übersicht über die experimentell ermittelten Spaltmengen für die Inkubation mit  $\text{MgCl}_2$ , die errechneten Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

$\text{MgCl}_2$ [mM]	Exp. 1 [%]	Exp. 2 [%]	Exp. 3 [%]	$\bar{x}$ [%]	$\sigma$ [%]
0	32.4	32.9	27.0	30.8	3.0
1	62.8 <sup>xv</sup>	37.8	40.8	39.3	1.5
2	73.5 <sup>xv</sup>	40.2	43.4	41.8	1.6
5	93.0 <sup>xv</sup>	38.6	36.2	37.4	1.2
10	53.0 <sup>xv</sup>	38.3	41.5	39.9	1.6

Auch hier ist wieder aus den berechneten Werten eine Grafik erstellt worden, die in *Abbildung 7-36* gezeigt ist:

<sup>xv</sup> wird als Ausreisser bewertet und nicht berücksichtigt



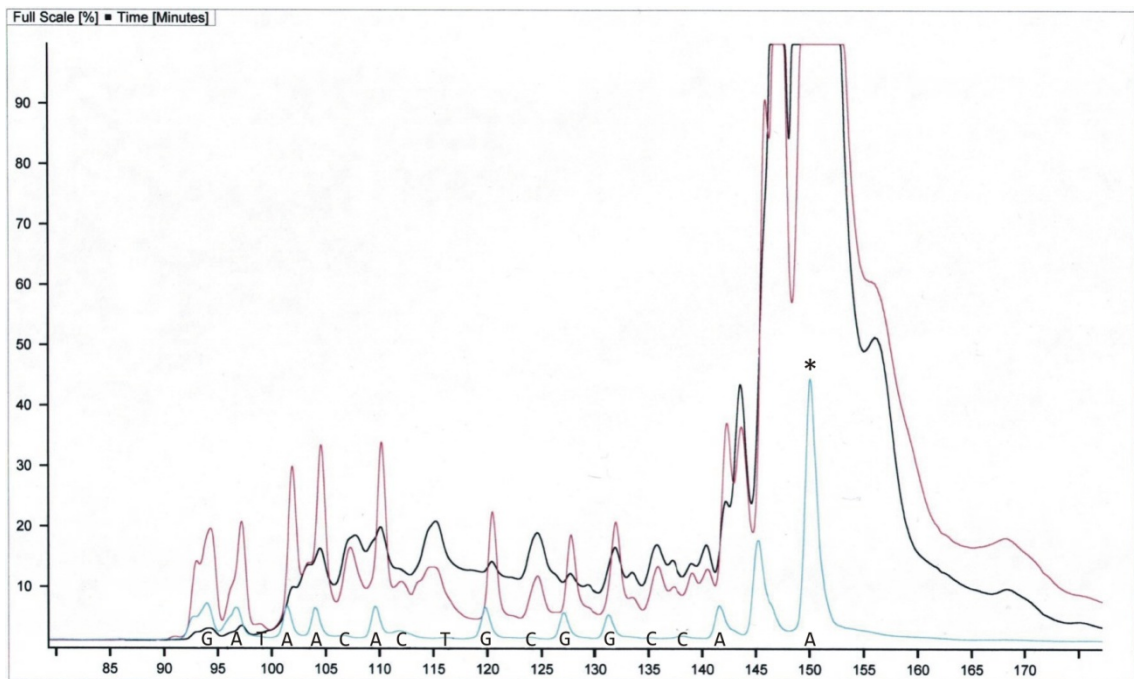
**Abbildung 7-36:** Grafische Darstellung des Mittelwertes und der Standardabweichung der  $\text{MgCl}_2$ -abhängigen Spaltexperimente von 4 mM **45** mit pUC19-Plasmid-DNA. Die Menge der open-circle-Form bleibt trotz zunehmender  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration annähernd konstant.

Man sieht, dass keine signifikante Änderung in der Spalt-Aktivität vorliegt. Die Spalt-Effizienz von **45** kann also nicht durch Zugabe von  $\text{MgCl}_2$  erhöht werden.

### 7.3.3.5 Identifizierung von präferierten Spaltstellen

Der Bisguanidinium-Alkohol **45** besitzt -wie bereits erwähnt- keinerlei Spezifität für eine bestimmte DNA-Sequenz. Es ist allerdings möglich, dass die in den vorangegangenen Experimenten beobachtete DNA-Spaltung durch Depurinierung induziert wurde. Um nun zu testen, ob **45** besonders häufig dort DNA spaltet, wo Purine vorhanden sind, wurde diesmal die 25-mer Helix **146** bei den sonst üblichen Bedingungen mit **45** inkubiert. Eine Darstellung der Analytik dieses Experiments ist in *Abbildung 7-37* zu sehen. Die Zuordnung möglicher Spaltprodukte sollte über eine G+A-Leiter von **146** erfolgen (siehe dazu Kapitel 7.3.7).

Die violette Linie stellt die Analyse der Inkubation mit **45** dar, und im Gegensatz zu der Purin-Leiter ist hier bei jeder Nukleobase ein Peak zu erkennen. Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass **45** keine große Präferenz für Purine aufweist, denn andernfalls hätte man in diesem Experiment ein zur blauen Linie sehr ähnliches Peakmuster erhalten.



**Abbildung 7-37:** Trennung (PAGE) der Spaltfragmente des Cy5-markierten Stranges des DNA-Duplex **146** nach 20 stündiger Inkubation mit **45**. Die blaue Linie entspricht einer Purin-Leiter des Cy5-Stranges, die violette Linie stellt das Ergebnis der Inkubation mit **45** dar; die schwarze steht für die Inkubation mit **95**. Der vollständige, nicht gesplante Cy5-Strang wurde mit einem \* markiert.

### 7.3.3.6 Stabilitätsuntersuchungen in HEPES-Puffer

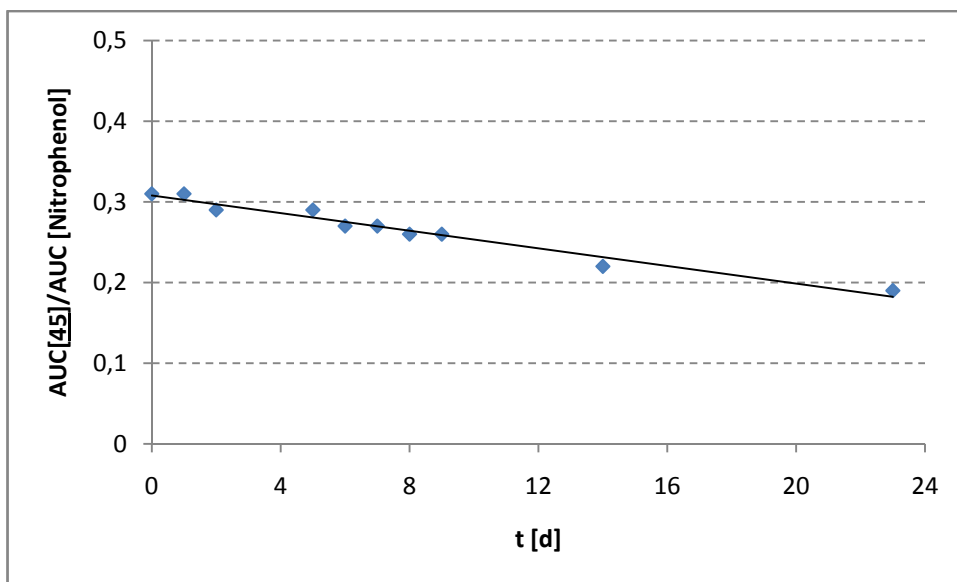
Zur besseren Bewertung der Spaltergebnisse wurde **45** auf Stabilität in wässrigen Pufferlösungen untersucht. Dazu wurde **45** bei Standard-Bedingungen für mehrere Tage inkubiert, wobei in gewissen Abständen eine Probe dieser Mischung entnommen wurde. Da hier HPLC-Analytik durchgeführt werden sollte, wurde noch 4-Nitrophenol als interner Standard zugegeben, welches unter den gegebenen Bedingungen inert ist, und damit als konstant angesehen wird. Aus den erhaltenen Peakflächen wurde dann der Quotient von **45** und 4-Nitrophenol gebildet (*Tabelle 7-13*) und anschließend in *Abbildung 7-38* aufgetragen.

Der Tabelle kann man eine langsame, aber stetige Abnahme der Peakfläche von **45** entnehmen, während die AUC von 4-Nitrophenol in etwa konstant bleibt.

**Tabelle 7-13:** Liste der verschiedenen AUC-Werte von **45** bzw. Nitrophenol und des daraus berechneten Quotienten.

$t$ [d]	AUC [45]	AUC [Nitrophenol]	AUC [45]/AUC [Nitrophenol]
0	23.435	76.565	0.31
1	23.494	76.506	0.31
2	22.567	77.433	0.29
5	22.082	76.968	0.29
6	20.740	76.498	0.27
7	20.513	76.579	0.27
8	19.892	76.879	0.26
9	19.708	76.011	0.26
14	17.043	77.051	0.22
23	14.515	77.154	0.19

Der berechnete Quotient fällt daher ebenso stetig ab und ist zur besseren Verdeutlichung in einer Grafik dargestellt:



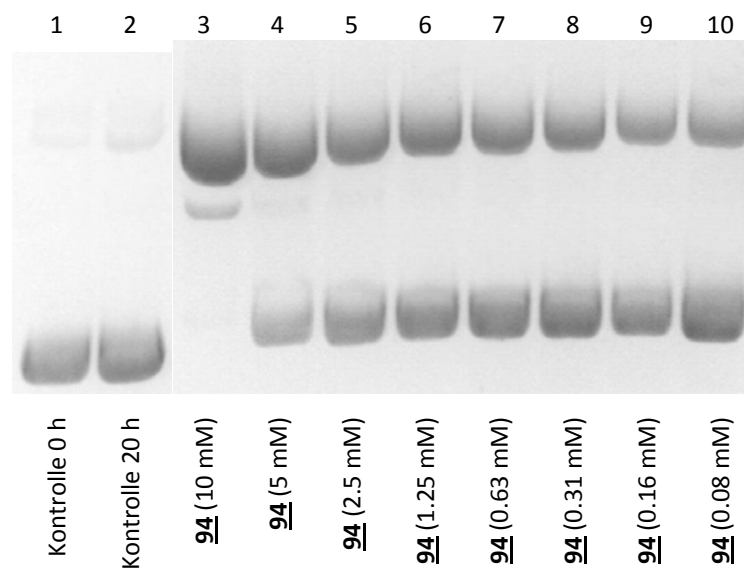
**Abbildung 7-38:** Grafische Darstellung des Quotienten der AUC von **45** und der AUC von Nitrophenol. Es ist deutlich eine langsame aber stetige Abnahme der Menge von **45** zu erkennen.

Aus der Grafik kann man ablesen, dass die Stabilität von **45** für die in Kapitel 7.3.3 durchgeführten Experimente ausreichend ist.

### 7.3.4 Reaktion mit der Bisguanidinium-Carbonsäure 94

Wie bereits in Kapitel 7.3.2 beschrieben, wurde durch Zufall ein neues Molekül entdeckt, das eine ungeahnte Aktivität bezüglich der Spaltung von Plasmid-DNA aufweist. Diese Bisguanidinium-Carbonsäure sollte daher ein wenig genauer auf ihre Eigenschaften untersucht werden.

Superspiralisierte pUC19-DNA wurde zu diesem Zweck bei den üblichen Bedingungen mit 94 inkubiert und danach mit einem Agarose-Gel analysiert. Das Resultat der Analytik ist in *Abbildung 7-39* dargestellt:



**Abbildung 7-39:** Agarose-Gel-Elektrophorese von pUC19-Plasmid-DNA, die mit 94 in absteigender Konzentration inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), darunter linear (Form III, nur zu sehen in Lane 3), unten supercoiled-DNA (Form I).

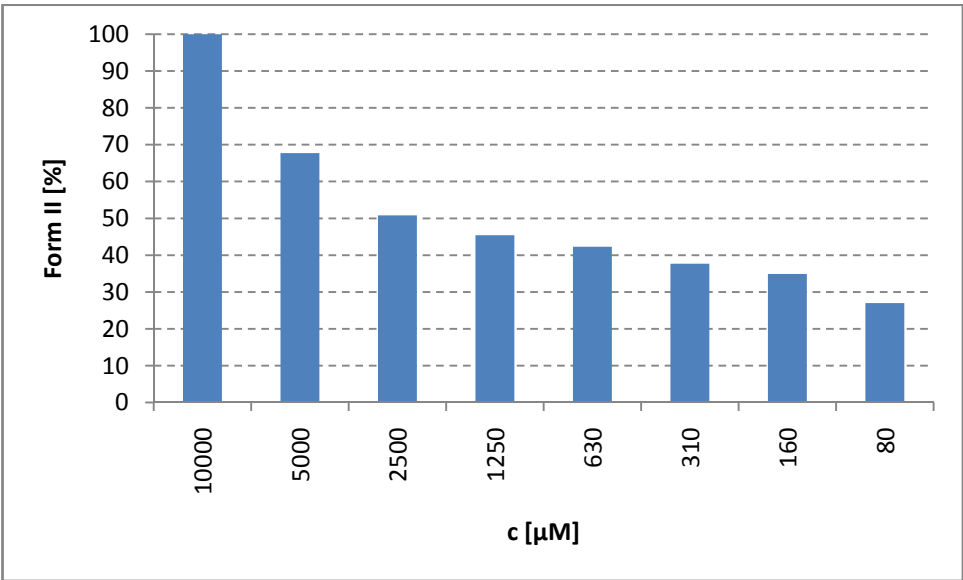
Die Lanes 1 und 2 zeigen wieder die Kontrollen, wobei der Background in Lane 2 nach 20 h mit 6 % recht gering ist. Die Lanes 3 bis 10 zeigen absteigende Konzentrationen für 94, wobei man in Lane 3 wieder eine quantitative Umwandlung in Form II (und Form III) beobachten kann. Erwartungsgemäß sinkt die Transformation in Form II mit abnehmender Konzentration, wenn auch Lane 10 mit 80  $\mu$ M 94 noch eine deutliche Spaltung zeigt.

Die Quantifizierung der Spaltung ist in *Tabelle 7-14* aufgelistet und in *Abbildung 7-40* nochmals dargestellt:

**Tabelle 7-14:** Quantifizierung der Umwandlung von supercoiled Plasmid-DNA in open-circle-DNA (oc), In der Spalte „oc“, die die Summe aus open-circle und linearer DNA enthält, sind die Werte inklusive Hintergrund angegeben.

Lane	Molekül	oc [%]	Lane	Molekül	oc [%]
1	Kontrolle 0 h	1.6	6	<u>94</u> (1.25 mM)	45.4
2	Kontrolle 20 h	6.1	7	<u>94</u> (0.63 mM)	42.3
3	<u>94</u> (10 mM)	100.0	8	<u>94</u> (0.31 mM)	37.7
4	<u>94</u> (5 mM)	67.7	9	<u>94</u> (0.16 mM)	34.9
5	<u>94</u> (2.5 mM)	50.8	10	<u>94</u> (0.08 mM)	27.0

Die Auswertung lässt darauf schließen, dass man die Konzentration von 94 noch weiter absenken, und dabei bis zu einer gewissen (noch unbekannten Konzentration) eine Spaltung beobachten kann. Im Vergleich mit 45 erscheint 94 als deutlich reaktiver.



**Abbildung 7-40:** Grafische Darstellung der durch 94 induzierten Spaltmengen (open-circle + linear) als Balkendiagramm. Man kann hier deutlich einen Trend in der Aktivität von 94 beobachten, wobei die hier untersuchten Konzentrationen noch nicht den kompletten aktiven Bereich von 94 einschließen.

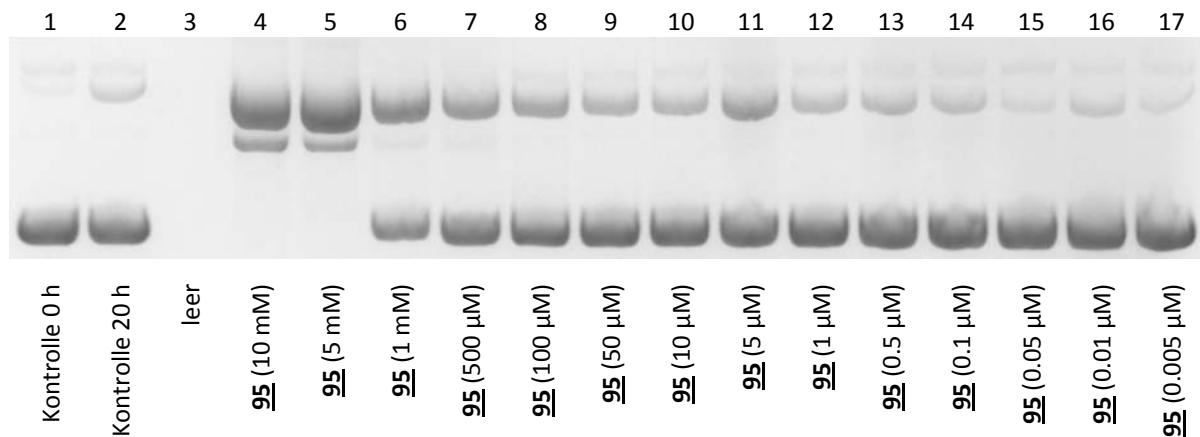
Die Bisguanidin-Carbonsäure 94 wurde aus Zeitgründen hier nicht weiter untersucht, stellt jedoch eine interessante Verbindung für zukünftige Studien dar, denn die hohe Aktivität von 94 gegenüber Plasmid-DNA könnte auf genereller Säurekatalyse durch die COOH-Funktion beruhen.



### 7.3.5 Reaktion mit dem Bisamin 95

Im durchgeführten Experiment aus Kapitel 7.3.2 hat sich 95 als unerwartet aktiv erwiesen. Um die guten Resultate der Plasmid-Spaltung für 95 zu reproduzieren und den Konzentrationsbereich zu bestimmen, in dem noch Spaltung beobachtet werden kann, wurde erneut pUC19-DNA mit verschiedenen Konzentrationen von 95 inkubiert.

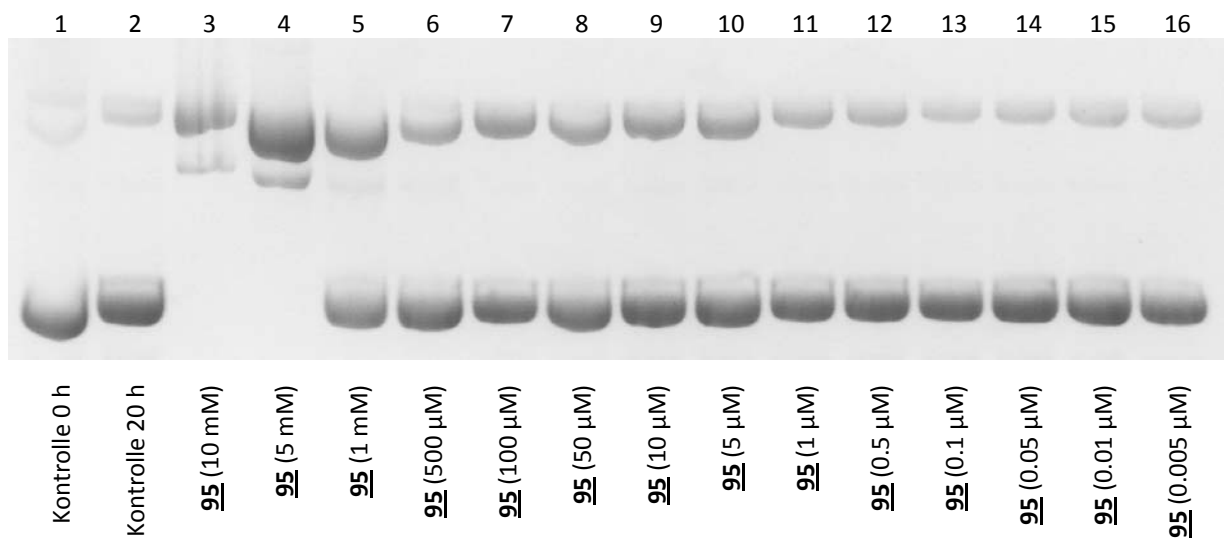
*Abbildung 7-41* zeigt zunächst wieder Kontroll-Lanes, gefolgt von der abnehmenden Konzentration von 95 (beginnt bei 10 mM und endet bei 5 nM). Aus der Abbildung kann man in den Lanes 4 und 5 zunächst wieder vollständige Umwandlung in die nicked- und lineare Form entnehmen. Ab Lane 6, die 1 mM 95 entspricht, tritt neben der unvollständigen Spaltung fast nur noch die nicked-Form auf. Der Wert für die Spaltung sinkt wie erwartet immer weiter, und ab etwa Lane 13 lässt sich durch pure Betrachtung im Hinblick auf die Hintergrund-Reaktion keine sichere Aussage mehr über vorhandene Spaltung treffen.



**Abbildung 7-41:** Agarose-Gel-Elektrophorese von pUC19-Plasmid-DNA, die mit 95 in absteigender Konzentration (von 10 mM bis 0.005 µM) inkubiert wurde (Standard-Bedingungen). Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), darunter linear (Form III, nur zu sehen in Lane 3), unten supercoiled-DNA (Form I).

Da der Background über 20 h auf ~11 % angewachsen ist, kann nur bis zur Lane 11 (5 µM 95) von einer signifikanten Spaltung gesprochen werden. Dennoch erscheint 95 genauso wie 94 als deutlich reaktiver in Vergleich zu 45.

Eine weitere Reproduktion der Plasmid-Spaltung ist für eine bessere statistische Aussage mit absteigenden Konzentrationen von 95 unter konstanten experimentellen Bedingungen durchgeführt worden. Die *Abbildung 7-42* zeigt ein Bild der Agarose-Gel-Elektrophorese, die in guter Näherung die bereits ermittelten Werte des vorangegangenen Experiments bestätigt.



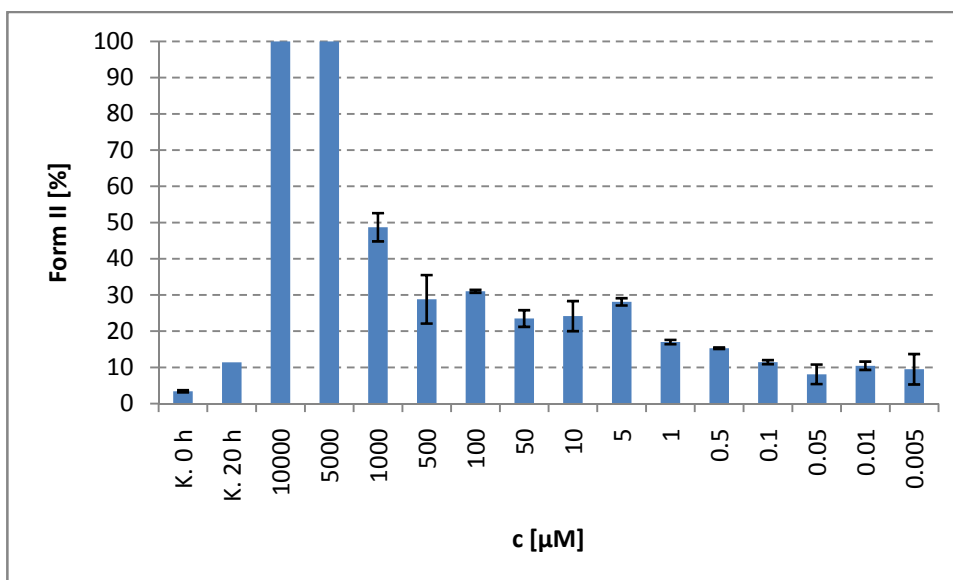
**Abbildung 7-42:** Agarose-Gel-Elektrophorese (Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die mit 95 in absteigender Konzentration (wieder von 10 mM bis 0.005 µM) inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), darunter linear (Form III, nur zu sehen in Lane 3), unten supercoiled-DNA (Form I).

Man findet in den Lanes 3 und 4 wieder vollständige Umwandlung in die nicked- bzw. lineare Form. In den folgenden Lanes nimmt die Spaltung erwartungsgemäß wieder mit der Konzentration ab. Die quantitative Auswertung der beiden Gel-Elektrophoresen ist zusammen mit den berechneten Mittelwerten und Standardabweichungen in *Tabelle 7-15* aufgeführt:

**Tabelle 7-15:** Übersicht über die experimentell ermittelten Spaltmengen, die errechneten Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

<i>c</i> [µM]	1. Experiment [%]	2. Experiment [%]	$\bar{x}$ [%]	$\sigma$ [%]
Kontrolle 0 h	3.7	3.1	3.4	0.3
Kontrolle 20 h	11.4	11.4	11.4	0.0
10000	100.0	100.0	100.0	0.0
5000	100.0	100.0	100.0	0.0
1000	52.6	44.8	48.7	3.9
500	35.5	22.1	28.8	6.7
100	30.6	31.4	31.0	0.4
50	21.2	25.8	23.5	2.3
10	20.0	28.3	24.2	4.2
5	29.1	27.1	28.1	1.0
1	16.4	17.6	17.0	0.6
0.5	15.5	15.1	15.3	0.2
0.1	12.0	10.9	11.5	0.6
0.05	5.4	10.8	8.1	2.7
0.01	9.3	11.6	10.5	1.2
0.005	5.3	13.7	9.5	4.2

In *Abbildung 7-43* sind die kalkulierten Mittelwerte nebst Standardabweichung in einem Säulendiagramm dargestellt:



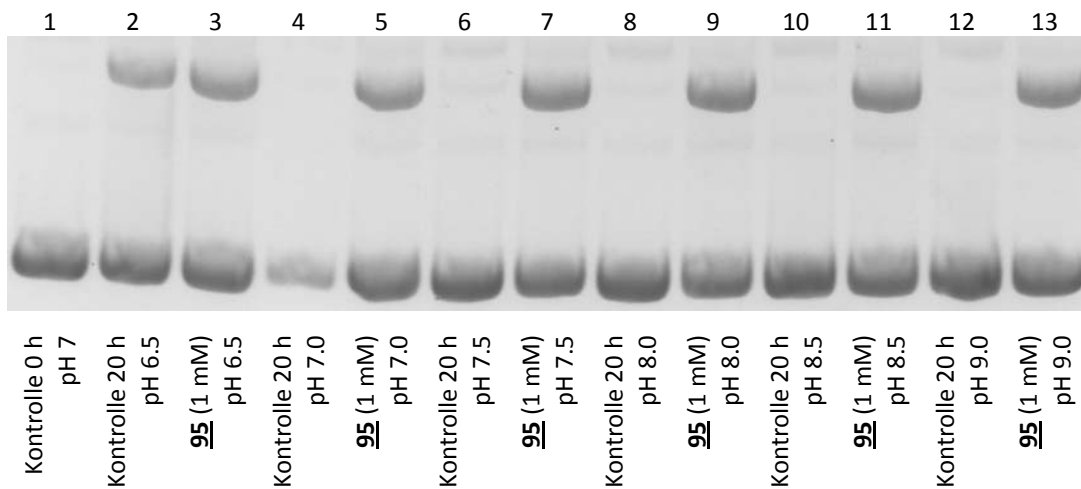
**Abbildung 7-43:** Darstellung der errechneten Mittelwerte aus *Tabelle 7-15*. Die schwarzen Indikatoren stehen für die Standardabweichung  $\sigma$ .

Die obige Abbildung bestätigt die zuvor vermutete Mindestkonzentration von 5 µM **95** für eine signifikante Spaltung. Vergleicht man diese Darstellung mit *Abbildung 7-40* wird deutlich, dass Molekül **95** sogar noch reaktiver ist als die Bisguanidinium-Carbonsäure **94**.

### 7.3.5.1 pH-Abhängigkeit der Plasmid-Spaltung

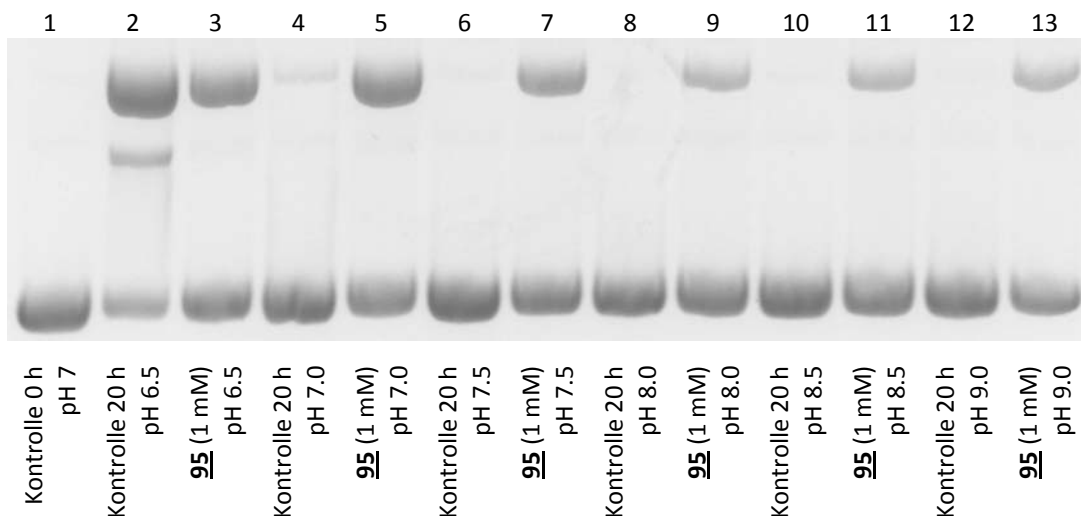
Wie schon **45** in Kapitel 7.3.3.1, ist auch der Bisamino-Alkohol **95** bei verschiedenen pH-Werten auf seine Spalt-Aktivität hin untersucht worden. Da **95** im Unterschied zu **45** keine Guanidine sondern Amine trägt, sollte in diesem Fall durchaus ab einem bestimmten pH die Spalt-Fähigkeit verschwinden.

In einem ersten Experiment wurde dazu pUC19-DNA bei den üblichen experimentellen Bedingungen mit 1 mM **95** inkubiert, wobei der HEPES-Puffer (mit NaOH oder HCl) auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt wurde. Die Analytik dieser Versuchsreihe ist in *Abbildung 7-44* dargestellt. Auch hier kann man wieder einen starken Abbau der Plasmid-DNA bei pH 6.5 beobachten, wie Lane 2 beweist. Für die übrigen pH-Werte erwies sich die DNA als stabil.



**Abbildung 7-44:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die bei verschiedenen pH-Werten mit 95 inkubiert wurde (variabler pH von 6.5 bis 9). Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

Wie schon vorher, wurde auch dieses Experiment zwecks Prüfung auf Reproduzierbarkeit mit den gleichen Parametern wiederholt, und die Gel-Analytik ist in *Abbildung 7-45* dargestellt:



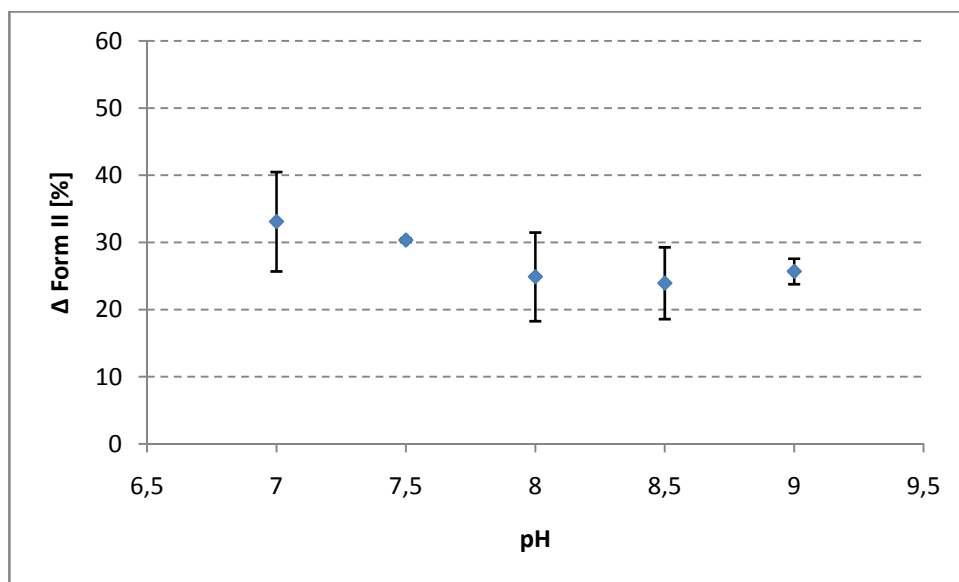
**Abbildung 7-45:** Agarose-Gel (Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die bei verschiedenen pH-Werten mit 95 inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I). Zusätzlich tritt in diesem Experiment (siehe Lane 2) auch noch lineare DNA auf.

Auch hier zeigt sich in Lane 2 die Plasmid-DNA als instabil unter leicht sauren Bedingungen. Bei pH-Werten ab 7 (und basischer) liegt die pUC19-DNA wie erwartet stabil in der supercoiled-Form vor. In *Tabelle 7-16* sind die Auswertungen beider Experimente gezeigt:

**Tabelle 7-16:** Übersicht über die experimentell ermittelten Spaltmengen, die errechneten Mittelwerte ( $\bar{\sigma}$ ) und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

pH	1. Exp. [%]	2. Exp. [%]	$\bar{\sigma}$ [%]	$\sigma$ [%]
6.5	nicht auswertbar	nicht auswertbar	-	-
7.0	25.7	40.5	33.1	7.4
7.5	30.6	30.1	30.4	0.3
8.0	31.5	18.3	24.9	6.6
8.5	29.3	18.6	24.0	5.3
9.0	27.6	23.8	25.7	1.9

Die Mittelwerte und Standardabweichungen aus *Tabelle 7-16* sind zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit in einem Diagramm aufgeführt:



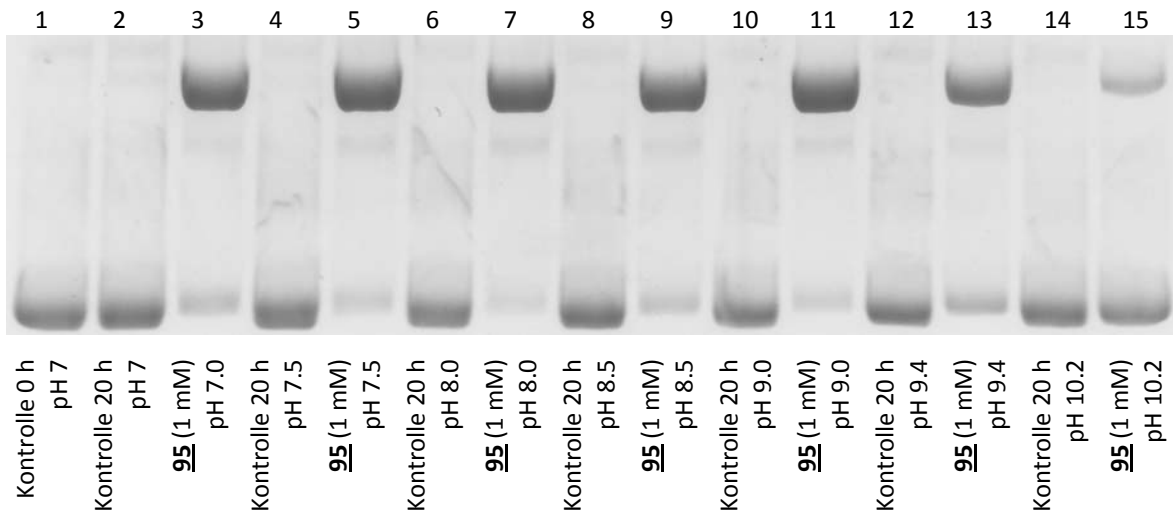
**Abbildung 7-46:** Graphische Darstellung der Ergebnisse aus *Tabelle 7-16*. Wie schon für **45** gezeigt, wird die DNA bei saurem pH stark abgebaut, was zu stark schwankenden Werten führt. Für den neutralen und basischen pH-Bereich sind die erhaltenen Werte deutlich konsistenter.

Aus obiger Abbildung kann man für den hier untersuchten pH-Bereich kein ausgeprägtes Maximum für die Spaltaktivität von **95** ablesen. Ebenso ist der erwartete Einbruch der Aktivität auch bei pH 9 ausgeblieben, was dafür spricht, dass die Amino-Gruppen nicht deprotoniert werden konnten. Die Menge der Form II-DNA nimmt von pH 7 bis 9 nur sehr leicht ab.

Um aber doch noch den Wert zu finden, an dem die DNA-Spaltung ausbleibt, wurde das Experiment nochmals wiederholt, wobei diesmal der Bereich auf pH 7 bis 10.2 ausgeweitet wurde. Andere Parameter sind nicht geändert worden und daher als konstant anzusehen.

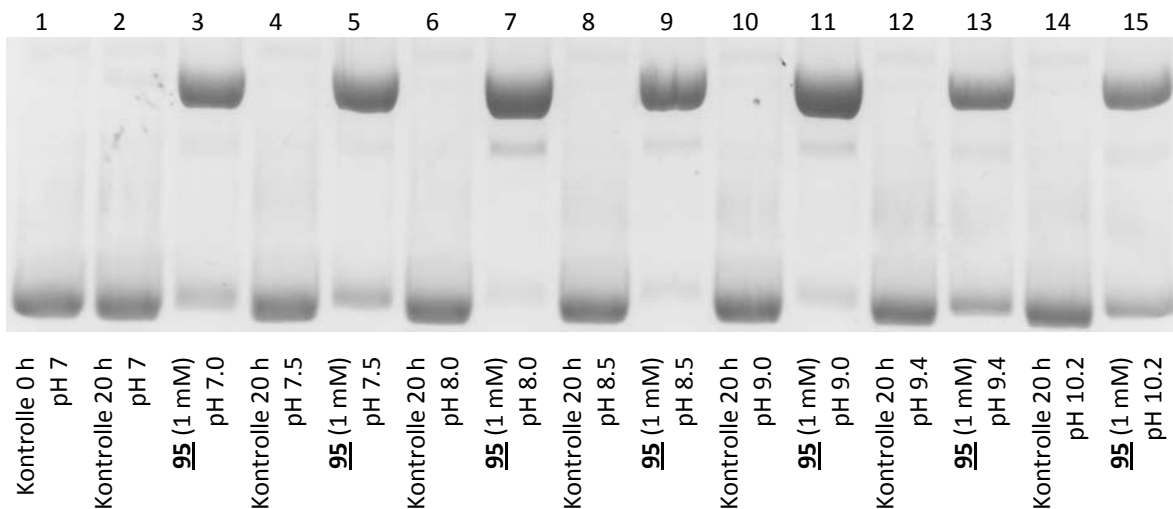
Um auch wieder eine statistische Aussage über das Experiment machen zu können, sind gleich drei Testreihen angesetzt und untersucht worden, von denen zwei in *Abbildung 7-47* und *Abbildung 7-48* gezeigt sind.

Die qualitative Betrachtung von *Abbildung 7-47* zeigt dann auch eine deutliche Abnahme der gebildeten Form II-DNA bei den pH-Werten 9.4 und 10.2. Im Bereich zwischen pH 7 und 9 blieb die Spaltung auf einem annähernd gleich hohen Niveau.



**Abbildung 7-47:** Agarose-Gel (Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die bei verschiedenen pH-Werten mit 95 inkubiert wurde (variabler pH von 7 bis 10.2). Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

Einen recht ähnlichen Trend zeigt auch die Reproduktion in *Abbildung 7-48*.



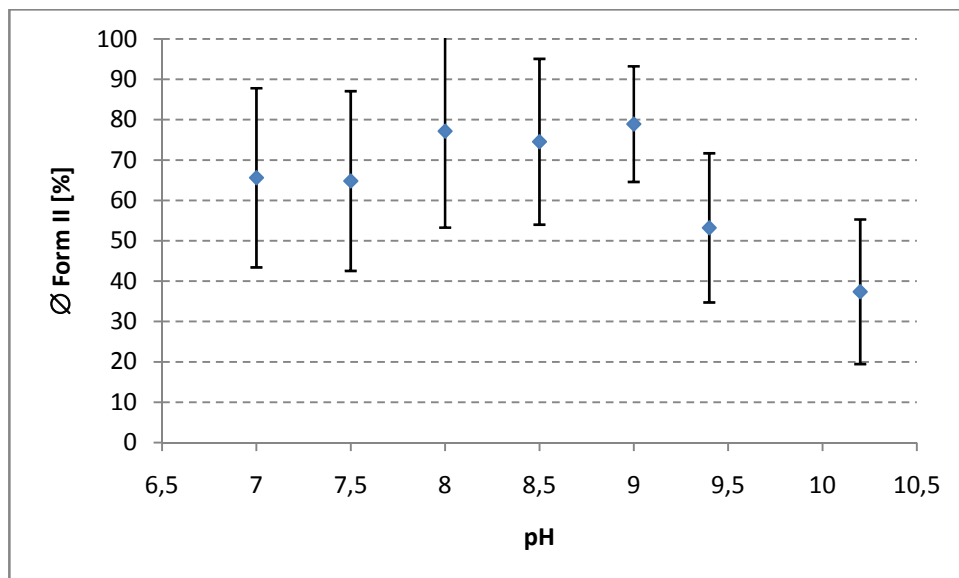
**Abbildung 7-48:** Agarose-Gel (zweite Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die bei verschiedenen pH-Werten mit 95 inkubiert wurde (variabler pH von 7 bis 10.2). Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

Für eine statistische Betrachtung der drei Experimente wurden alle drei Gele (auch das hier nicht abgebildete) elektronisch ausgewertet, und für jeden pH-Wert der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Alle Werte sind in *Tabelle 7-17* angegeben:

**Tabelle 7-17:** Übersicht über die experimentell ermittelten Spaltmengen, die errechneten Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

pH	Exp. 1 [%]	Exp. 2 [%]	Exp. 3 [%]	$\bar{x}$ [%]	$\sigma$ [%]
7.0	35.7	88.8	72.3	65.6	22.2
7.5	34.4	87.1	72.9	64.8	22.3
8.0	43.4	92.7	95.3	77.1	23.9
8.5	46.1	83.6	93.9	74.5	20.5
9.0	58.7	87.7	90.3	78.9	14.8
9.4	27.3	69.2	63.1	53.2	18.5
10.2	24.7	24.7	62.7	37.4	17.9

Betrachtet man alle 3 Experimente, kann man keine definitive Aussage über einen pH-Wert treffen, der die maximale Spaltung ermöglicht. Es lässt sich aber der Bereich eingrenzen, in dem die Spaltung am Besten möglich ist. Dieser Bereich liegt zwischen pH 7 und 9. Trotzdem ist dieses Experiment noch stark fehlerbehaftet, wie die Standardabweichungen anzeigen.



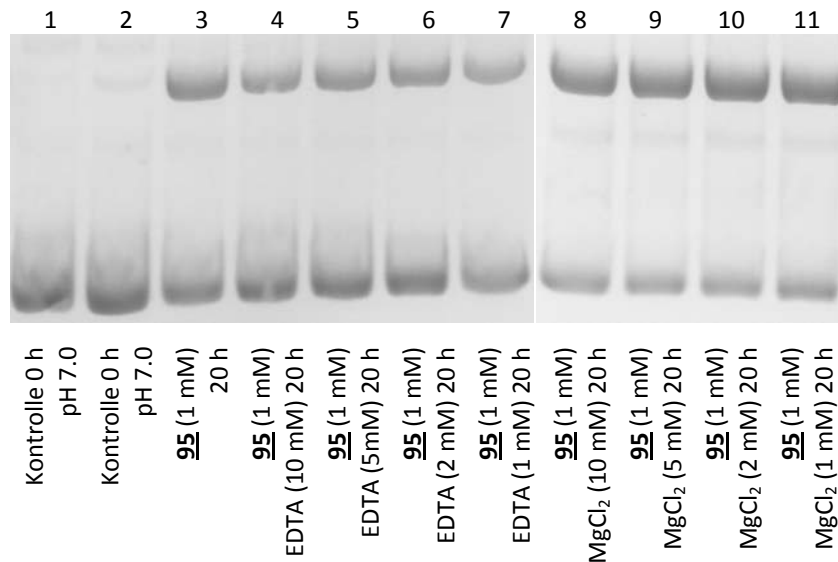
**Abbildung 7-49:** Graphische Darstellung der errechneten Mittelwerte (siehe *Tabelle 7-17*) der pH-abhängigen Spaltaktivität von 95. Als schwarze Fehlerbalken ist die Standardabweichung mit eingetragen, die starke Schwankungen der experimentellen Ergebnisse anzeigt.

Es lässt sich aber sagen, dass die Menge der Form II-DNA ab einem pH von 9.4 deutlich nachlässt, und mit steigendem pH tendenziell noch weiter absinkt. Dies könnte dafür sprechen, dass die Amino-Gruppen von 95 tatsächlich deprotoniert werden und so die Affinität von 95 gegenüber den Phosphaten stark vermindert wird.

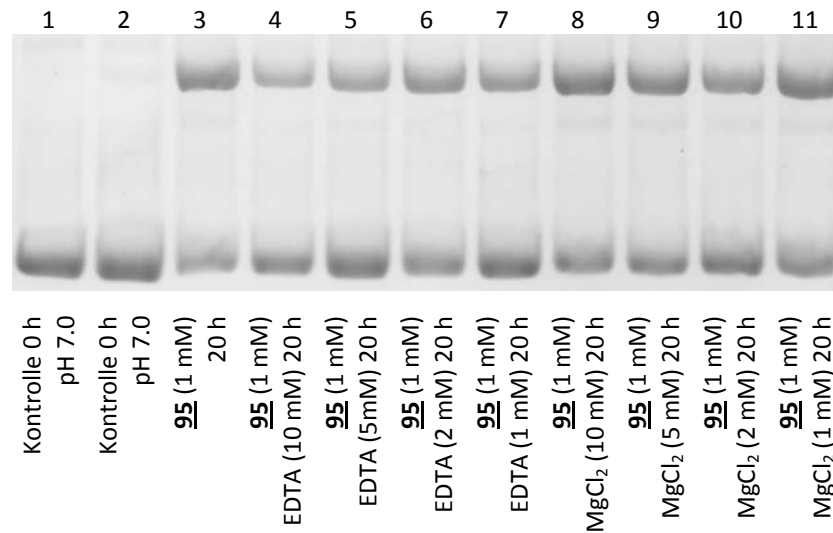
### 7.3.5.2 Einfluss von Metall-Ionen auf die DNA-Spaltung

Die in Kapitel 7.3.3.4 beschriebenen Untersuchungen mit EDTA bzw.  $\text{MgCl}_2$  sollten auch mit **95** durchgeführt werden. Dazu wurde **95** in einer Konzentration von 1 mM unter Standard-Bedingungen mit pUC19-DNA inkubiert, wobei definierte Mengen von 1, 2, 5 oder 10 mM EDTA oder  $\text{MgCl}_2$  zugegeben wurden. Für eine statistisch relevantere Aussage wurde das Experiment dreifach durchgeführt.

Die Analytik des ersten Experiments ist in *Abbildung 7-50* dargestellt und zeigt wieder zunächst die Kontrollen (Lanes 1 bis 3), gefolgt von 4 Lanes mit EDTA und weiteren 4 mit  $\text{MgCl}_2$ . Während sich bei Zugabe von EDTA verglichen mit der Kontrolle in Lane 3 nicht viel zu ändern scheint, sieht die Menge der open-circle-DNA bei Zugabe von  $\text{MgCl}_2$  etwas erhöht aus.

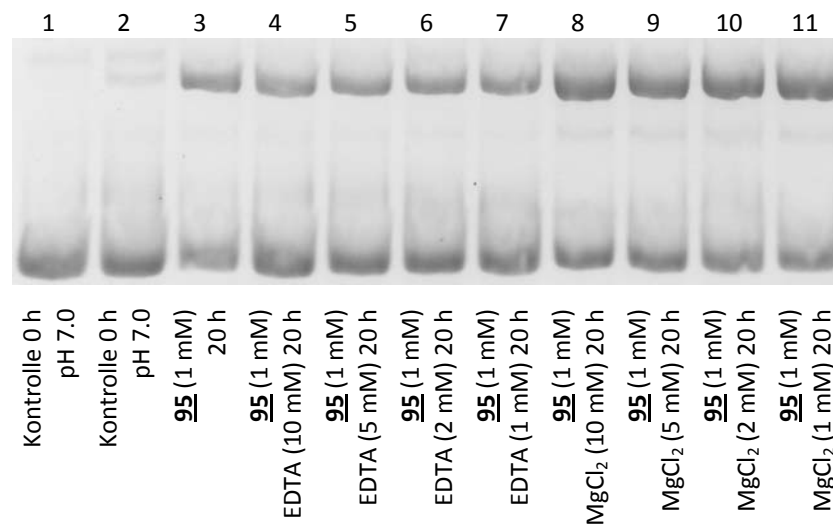






**Abbildung 7-51:** Agarose-Gel (Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von EDTA bzw.  $\text{MgCl}_2$  mit 95 inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

Die in *Abbildung 7-52* gezeigte zweite Reproduktion bestätigt die bisherigen Ergebnisse:



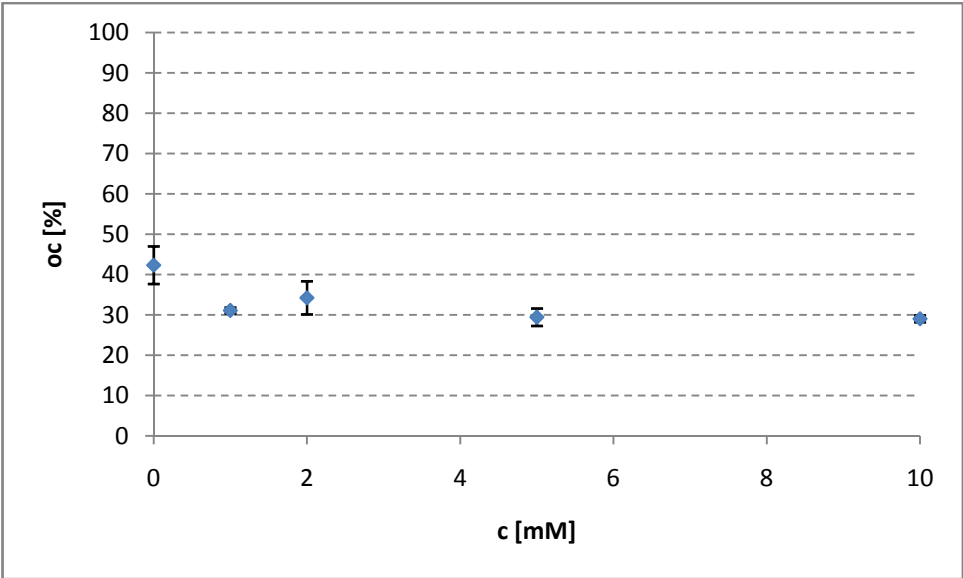
**Abbildung 7-52:** Agarose-Gel (zweite Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von EDTA bzw.  $\text{MgCl}_2$  mit 95 inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

Alle drei Analysen für die EDTA-Experimente sind ausgewertet worden und inklusive Mittelwert und Standardabweichung in *Tabelle 7-18* aufgelistet:

**Tabelle 7-18:** Übersicht über die experimentell ermittelten Spaltmengen für die Inkubation mit EDTA. Angegeben sind ebenso die errechneten Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

EDTA [mM]	Exp. 1 [%]	Exp. 2 [%]	Exp. 3 [%]	$\bar{x}$ [%]	$\sigma$ [%]
0	38.0	48.8	40.2	42.3	4.7
1	31.8	31.4	30.1	31.1	0.7
2	30.8	40.0	31.9	34.2	4.1
5	30.6	26.4	31.3	29.4	2.2
10	28.8	30.2	28.1	29.0	0.9

Besser lässt sich der Einfluss des zugegebenen EDTAs bestimmen, wenn man die Mittelwerte grafisch aufträgt. Aus *Abbildung 7-53* kann man entnehmen, dass die durch **95** induzierte Form II-DNA in der Menge tendenziell abnimmt, wenn auch nur wenig. Wie schon zuvor könnte der Grund hier wieder darin liegen, dass sich Ionenpaare von EDTA und **95** bilden, und so die generelle Spalt-Reaktion stören.



**Abbildung 7-53:** Grafische Darstellung des Mittelwertes und der Standardabweichung der EDTA-abhängigen Spaltexperimente von 1 mM **95** mit pUC19-Plasmid-DNA. Die Menge der open-circle-Form nimmt mit zunehmender EDTA-Konzentration tendenziell ab.

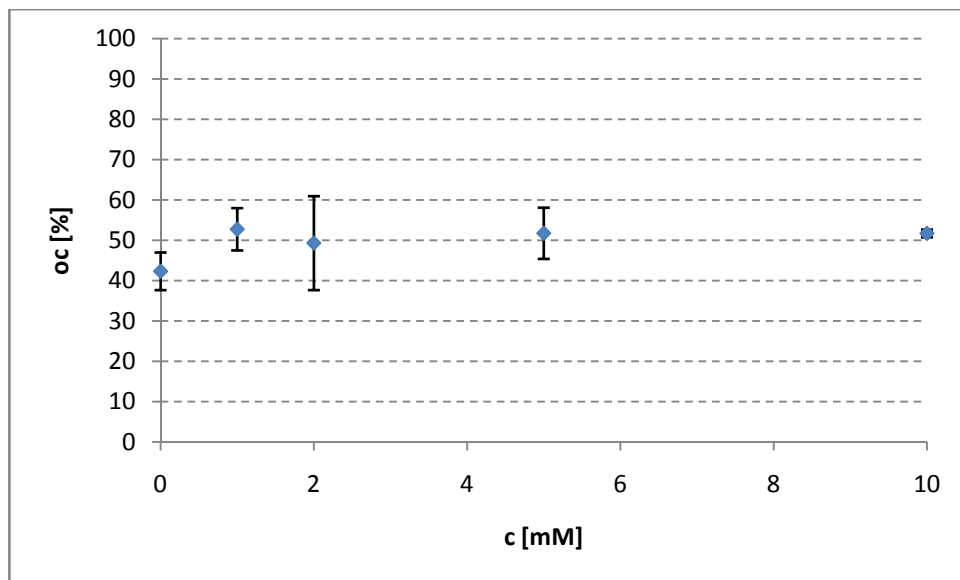
Trotzdem kann man sagen, dass die beobachtete Spaltung nicht durch eingeschleppte Metall-Ionen induziert wurde, welche DNA prinzipiell hydrolytisch spalten können. Ein oxidativer Mechanismus kann durch Zugabe von EDTA nicht ausgeschlossen werden.

Eine äquivalente Auswertung für die Testreihen mit  $\text{MgCl}_2$  findet sich in *Tabelle 7-19*:

**Tabelle 7-19:** Übersicht über die experimentell ermittelten Spaltmengen für die Inkubation mit  $\text{MgCl}_2$ . Angegeben sind ebenso die errechneten Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

$\text{MgCl}_2$ [mM]	Exp. 1 [%]	Exp. 2 [%]	Exp. 3 [%]	$\bar{x}$ [%]	$\sigma$ [%]
0	38.0	48.8	40.2	42.3	4.7
1	59.8	47.2	51.3	52.8	5.2
2	62.2	34.0	51.8	49.3	11.6
5	60.7	46.4	48.2	51.8	6.4
10	53.1	51.0	51.1	51.7	1.0

Hier kann man der grafischen Darstellung in *Abbildung 7-54* entnehmen, dass die Menge der Form II-DNA bei Zugabe von  $\text{MgCl}_2$  nur gering zunimmt. Wie schon für **45** lässt sich auch für **95** die Bildung der Form II-DNA nicht signifikant durch Zugabe von Mg-Ionen erhöhen.

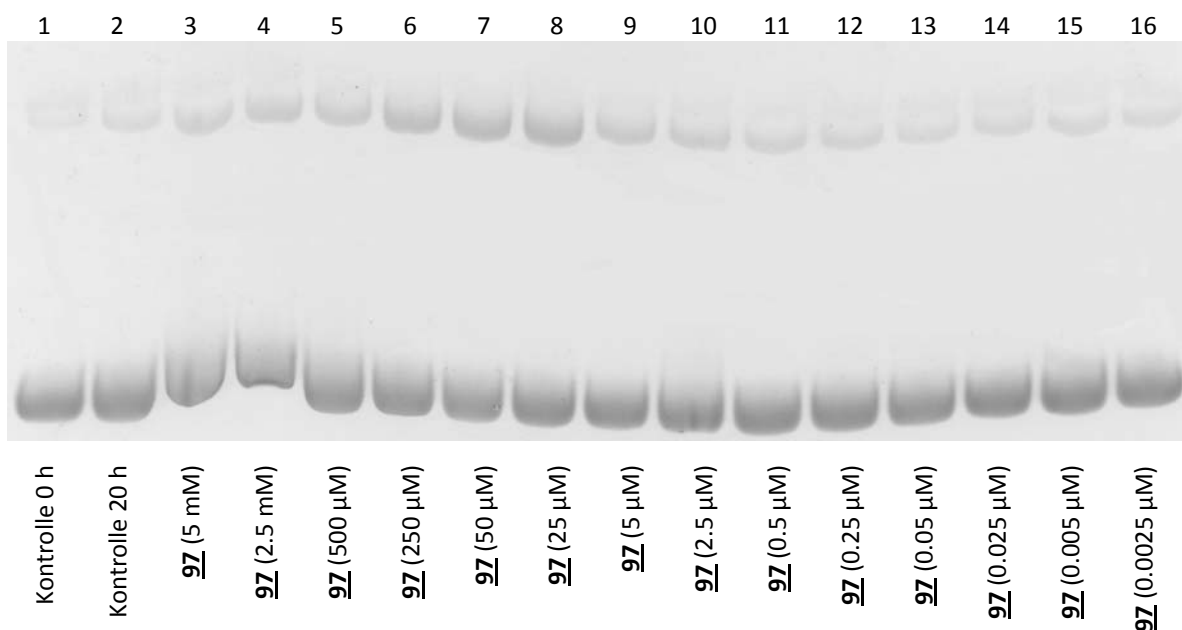


**Abbildung 7-54:** Grafische Darstellung der Mittelwerte der  $\text{MgCl}_2$ -abhängigen Spaltexperimente von 1 mM **95** mit pUC19-Plasmid-DNA. Die Grafik weist eine annähernd konstante Menge von open-circle-DNA bei steigender  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration auf.

### 7.3.6 Reaktion mit dem Bisperimidin 97

Wie bereits in Kapitel 6.1.5.2 erwähnt, sollte das Bisperimidin 97 ebenso eine interessante Verbindung für Plasmid-Spaltungs-Experimente darstellen. Daher wurde 97 in verschiedenen Konzentrationen zwischen 5 mM und 2.5 nM mit Plasmid-DNA inkubiert (Standard-Bedingungen).

Die Lanes 1 und 2, wie sie in *Abbildung 7-55* u.a. abgebildet sind, zeigen wieder die Kontrollen zum Zeitpunkt 0 h und 20 h. Es ist schon ohne Auswertungssoftware zu erkennen, dass bei allen Konzentrationen von 97 nur wenig supercoiled Plasmid-DNA in die nicked-Form überführt wurde.



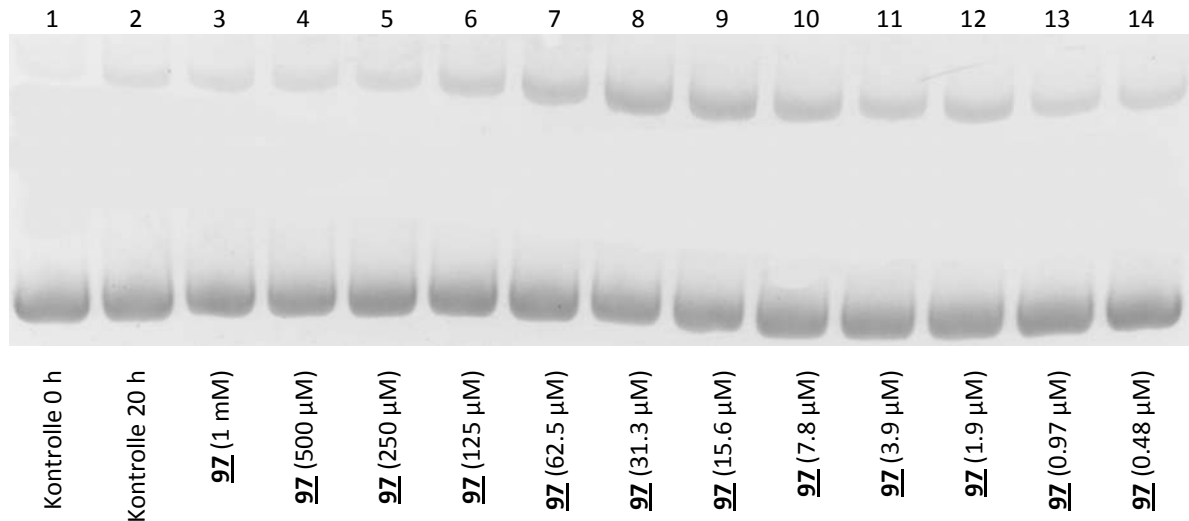
**Abbildung 7-55:** Agarose-Gel-Elektrophorese von pUC19-Plasmid-DNA, die mit 97 in absteigender Konzentration (von 5 mM bis 0.0025 µM) inkubiert wurde (Standard-Bedingungen). Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

Ein Maximum an Spaltung scheint in Lane 8 erkennbar zu sein. Interessant sind aber trotzdem die Lanes 3 und 4, die für die supercoiled DNA eine auffällige Retardierung der Laufstrecke aufweisen. Möglicherweise führt die Interkalation der Perimidin-Einheiten zwischen 2 Basen-Paare der DNA zu einer partiellen Entwindung der supercoiled DNA, was die elektrophoretischen Laufeigenschaften beeinflusst. Bei einer ersten Auswertung ergab sich ein Spalt-Maximum zwischen 250 und 5 µM.

In einem weiteren Experiment sollte die Spalt-Aktivität von 97 reproduziert und die Konzentration, die zur maximalen Spaltung führt genauer ermittelt werden.

Für die neuerliche Inkubation wurden dann Konzentrationen zwischen 1 mM und 480 nM verwendet, die unter Beibehaltung der bisher verwendeten Reaktionsbedingungen mit Plasmid-DNA umgesetzt wurden.

Wie auch in *Abbildung 7-55* sieht man für hohe Konzentrationen von **97** nur sehr wenig Spaltung, welche mit sinkender Menge zu- und dann wieder abnimmt. Das Maximum scheint bei Lanes 7 bis 9 zu liegen.



**Abbildung 7-56:** Agarose-Gel-Elektrophorese (Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die mit **97** in absteigender Konzentration (diesmal der Bereich von 1 mM bis 0.48 µM) inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

Die genauen Werte für die gebildete open-circle-DNA sind zusammenfassend in *Tabelle 7-20* aufgeführt.

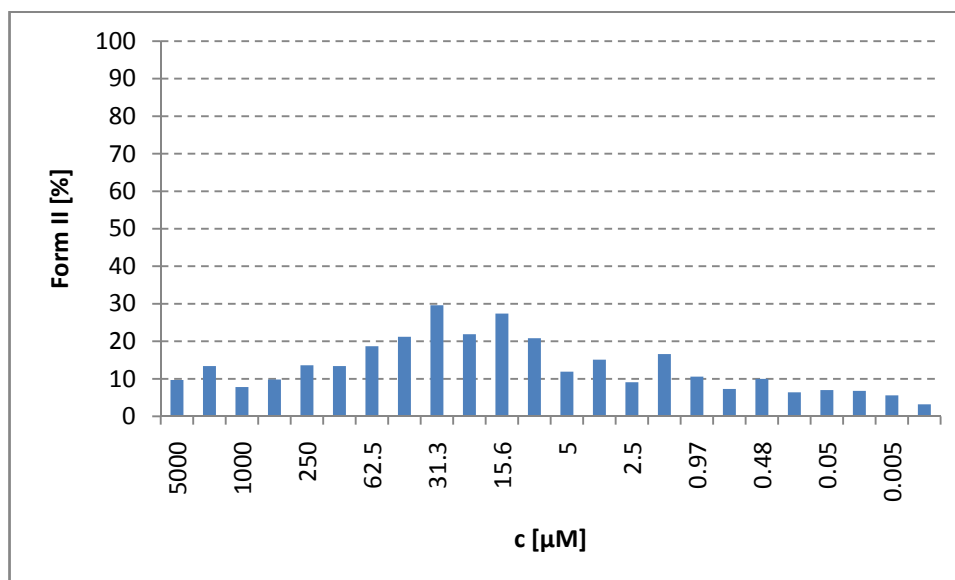
**Tabelle 7-20:** Übersicht über die bestimmten Mengen von open-circle-DNA (oc) aus den beiden vorangegangenen Experimenten.

Molekül	oc [%]	Molekül	oc [%]
Kontrolle 0 h	4.9	<b>97</b> (7.8 µM)	20.8
Kontrolle 20 h	7.1	<b>97</b> (5 µM)	11.9
<b>97</b> (5 mM)	9.7	<b>97</b> (3.9 µM)	15.1
<b>97</b> (2.5 mM)	13.4	<b>97</b> (2.5 µM)	9.1
<b>97</b> (1 mM)	7.8	<b>97</b> (1.9 µM)	16.6
<b>97</b> (500 µM)	9.8	<b>97</b> (0.97 µM)	10.6
<b>97</b> (250 µM)	13.6	<b>97</b> (0.5 µM)	7.3
<b>97</b> (125 µM)	13.4	<b>97</b> (0.48 µM)	10.0
<b>97</b> (62.5 µM)	18.7	<b>97</b> (0.25 µM)	6.4
<b>97</b> (50 µM)	21.2	<b>97</b> (0.05 µM)	7.0
<b>97</b> (31.3 µM)	29.6	<b>97</b> (0.025 µM)	6.8
<b>97</b> (25 µM)	21.9	<b>97</b> (0.005 µM)	5.6
<b>97</b> (16.5 µM)	27.4	<b>97</b> (0.0025 µM)	3.2

Wie man der Tabelle entnehmen kann, scheint **97** bei hohen Konzentrationen inaktiv zu sein, da keinerlei Spaltung nachzuweisen ist. Erst ab etwa 62.5 µM ist ein signifikanter Wert für

die Spaltung zu erkennen. Dieser Wert erreicht das Maximum bei etwa 31.3  $\mu\text{M}$  und sinkt dann wieder ab, bis er nicht mehr von Hintergrund zu unterscheiden ist.

Die ermittelten Werte sind zur besseren Übersicht in *Abbildung 7-57* grafisch aufgetragen:



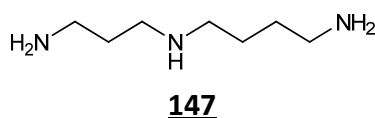
**Abbildung 7-57:** Grafische Darstellung der in *Tabelle 7-20* ermittelten Spaltmengen als Balkendiagramm. Die Grafik zeigt wieder einen ähnlichen Verlauf wie zuvor mit annähernder Inaktivität bei sehr großen und sehr kleinen Konzentrationen. Das auftretende Plateau konnte jetzt auf einen Bereich zwischen 7.8 und 62.5  $\mu\text{M}$  eingegrenzt werden.

Der Bisperimidinium-Alkohol **97** ist im Vergleich zu **94**, **45**, und **95** am wenigsten reaktiv. Und auch in dem Konzentrationsbereich, in dem **97** die größte Spaltung erzielt, erreichen die übrigen Moleküle ähnliche Werte.

Da sich das Perimidin-Derivat **97** als durchschnittlicher Spalter präsentierte, wurden keine weiteren Experimente durchgeführt.

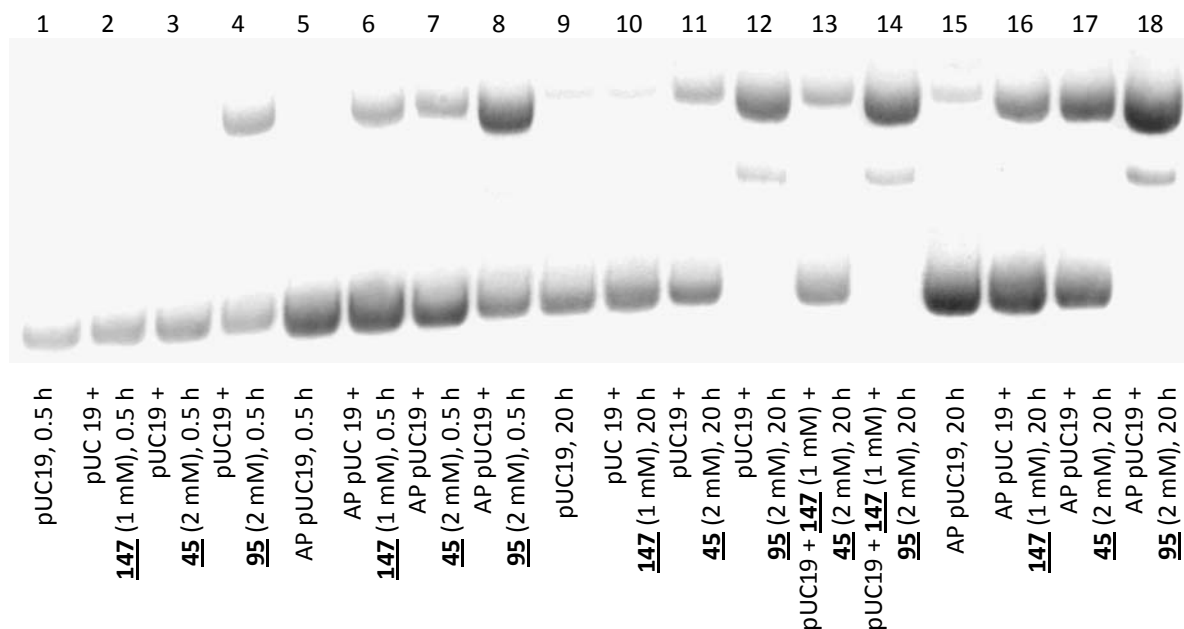
### 7.3.7 Einfluss von Apurin-Stellen auf die DNA-Spaltung von 45 und 95

Um auszuschließen, dass depurinierte Stellen in der Plasmid-DNA für die guten Spaltergebnisse von 94, 45 und 95 verantwortlich waren, wurde die DNA auf eben jene Defekte hin überprüft. Dazu wurde das pUC19-Plasmid (mit und ohne Apurin-Stellen) mit 1 mM Spermidin<sup>[xvi]</sup> inkubiert und anschließend wieder gelelektrophoretisch analysiert.



**Abbildung 7-58:** Strukturformel von Spermidin. Das Reagenz wird verwendet, um DNA an abasischen Stellen zu spalten.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zu haben, wurden die beiden Plasmid-Präparationen (sowohl intakte Plasmid-DNA als auch Apurin-Stellen enthaltende DNA) auch mit 45 und 95 inkubiert (0.5 bzw. 20 h). Die Lanes 1, 5, 9 und 15 in *Abbildung 7-59* sind Kontrollen für die Plasmid-DNA, bei denen keine Substanzen zugegeben wurden. Die Menge an entstehender nicked-DNA (bezüglich der Kontrollen) ist mit einem Maximum von 7 % in Lane 15 akzeptabel.



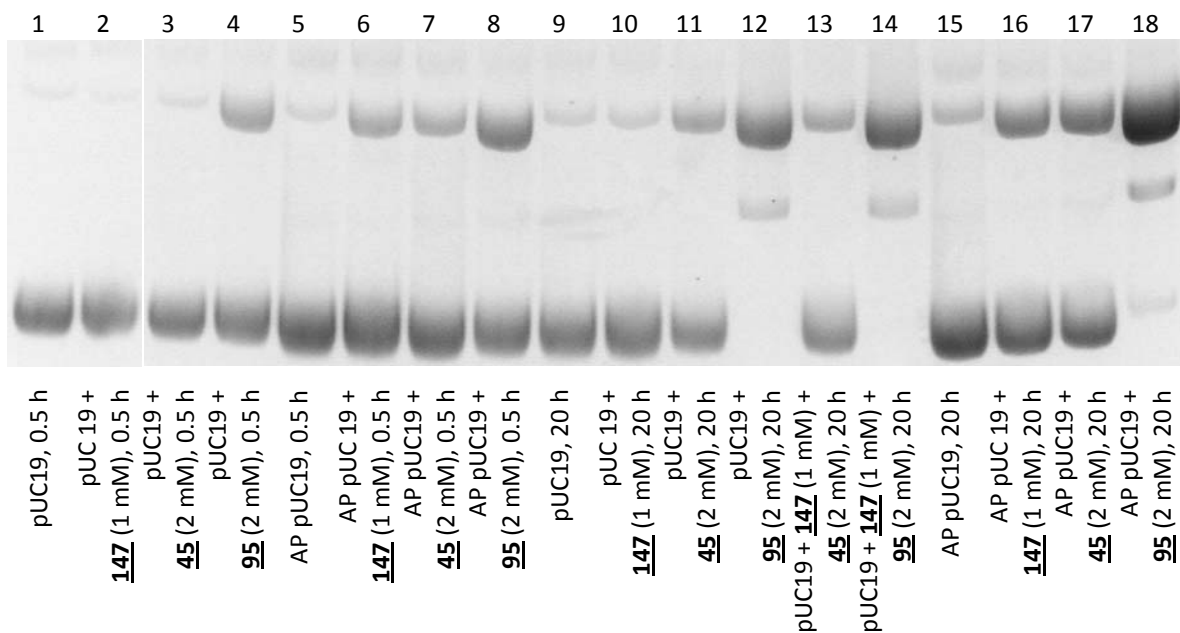
**Abbildung 7-59:** Agarose-Gel (erweiterte Testreihe) von unbehandelter bzw. Apurin-pUC19-DNA (angefärbt mit EtBr), die mit 147, 45 oder 95 inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I). In Lanes 12, 14 und 18 ist lineare DNA (Form III) zu erkennen.

<sup>xvi</sup> CAS-Nr.: 334-50-9

Die Inkubation mit **147** in Lane 2 liefert bei unbehandelter Plasmid-DNA selbst nach 20 h keine signifikanten Mengen der open-circle Form. Erst die Verwendung von AP-DNA (Lane 16) brachte eine ~32 %ige Spaltung nach 20 h. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass die normale, unbehandelte pUC19-DNA annähernd keine AP-Stellen aufweist.

Die Substanzen **95** und **45** zeigen sowohl mit normaler als auch mit AP-pUC19-DNA eine beträchtliche Spaltung, wobei die Menge bei **95** nach 20 h bei 100 % liegt, mit **45** aber nur ~31 % erreicht. Dies wiederum lässt den Schluss zu, dass die Spalt-Aktivität der beiden zuletzt genannten Moleküle zumindest nicht allein auf Depurinierung beruhen kann.

Um die erhaltenen Werte und die daraus resultierende Aussage untermauern zu können, wurde auch dieses Experiment unter den gleichen Bedingungen wie zuvor wiederholt. Die elektrophoretische Analytik stellt sich im Großen und Ganzen genauso wie in *Abbildung 7-59* dar, und reproduziert in guter Näherung die zuvor erhaltenen Werte.



**Abbildung 7-60:** Agarose-Gel-Elektrophorese (Reproduktion der erweiterten Testreihe) von unbehandelter bzw. Apurin-pUC19-Plasmid-DNA, die mit **147**, **45** oder **95** inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I). In einigen Lanes zu sehen ist die lineare DNA (Form III).

In *Tabelle 7-21* ist der jeweilige Mittelwert aus der Doppelbestimmung angegeben:



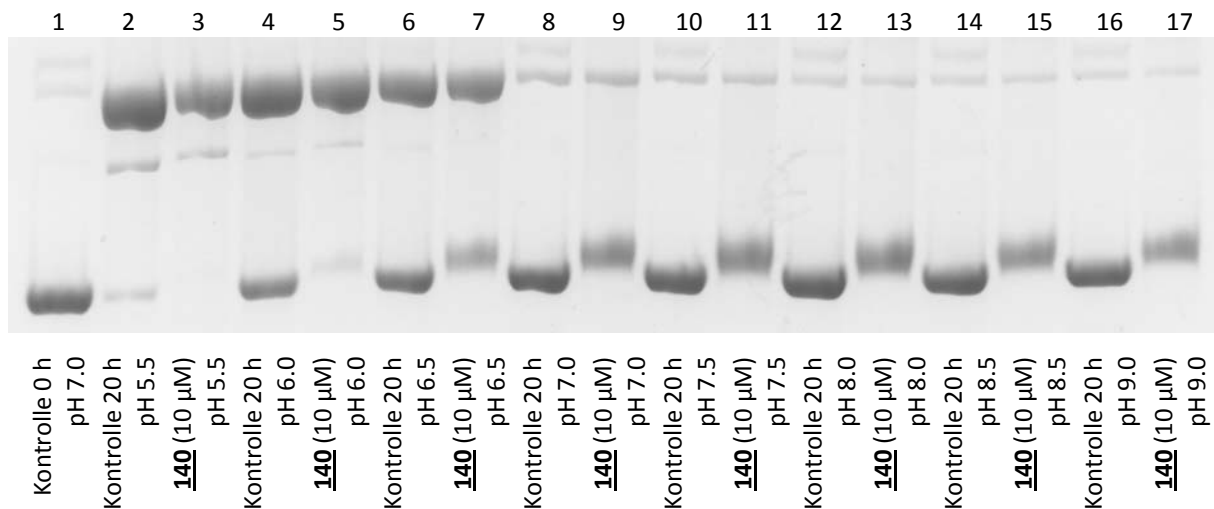
**Tabelle 7-21:** Quantifizierung der Umwandlung von supercoiled Plasmid-DNA in open-circle-DNA (oc). In der Spalte „oc“, die die Summe aus open-circle und linearer DNA enthält, sind die Werte inklusive Hintergrund angegeben.

<b>pUC19</b>	<b>Bedingungen</b>	<b>Ø oc [%]</b>	<b>pUC19</b>	<b>Bedingungen</b>	<b>Ø oc [%]</b>
normal	0.5 h	2.0	AP	0.5 h	3.6
normal	0.5 h, <b><u>147</u></b>	2.1	AP	0.5 h, <b><u>147</u></b>	22.8
normal	0.5 h, <b><u>45</u></b>	4.3	AP	0.5 h, <b><u>45</u></b>	18.8
normal	0.5 h, <b><u>95</u></b>	29.9	AP	0.5 h, <b><u>95</u></b>	47.1
normal	20 h	6.1	AP	20 h	8.1
normal	20 h, <b><u>147</u></b>	6.5	AP	20 h, <b><u>147</u></b>	30.7
normal	20 h, <b><u>45</u></b>	27.5	AP	20 h, <b><u>45</u></b>	41.9
normal	20 h, <b><u>95</u></b>	100.0	AP	20 h, <b><u>95</u></b>	98.3
normal	20 h, <b><u>147</u></b> + <b><u>45</u></b>	28.6			
normal	20 h, <b><u>147</u></b> + <b><u>95</u></b>	100.0			

### 7.3.8 Reaktion mit dem Polyamid-Bisamin 140

Im Kapitel 7.3 haben die sequenz-unselektiven Moleküle 94, 45 und 95 beachtliche Spalt-Aktivität gezeigt. Die prinzipielle Aktivität war somit vorhanden, und deshalb wurden die Experimente nun auf die selektiven Moleküle 140 und 46 ausgedehnt, die Derivate von 95 bzw. 45 darstellen.

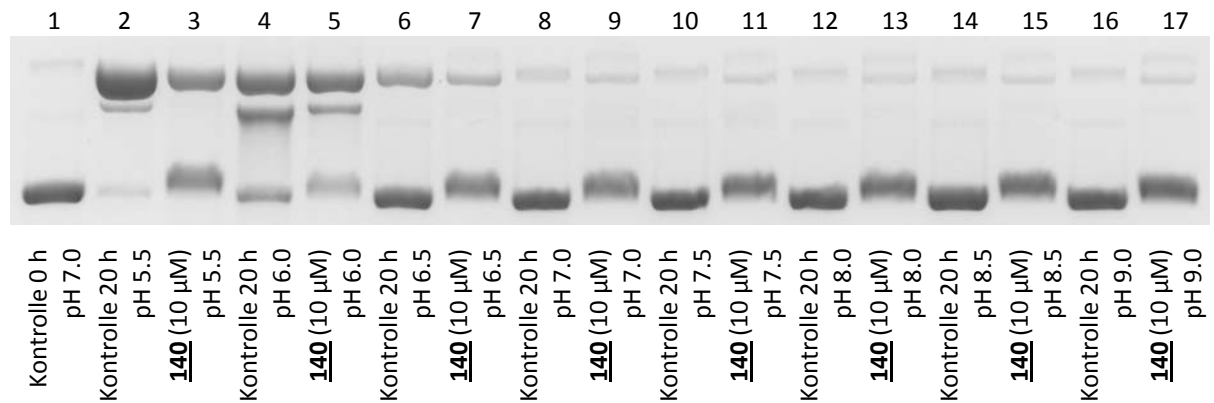
Zunächst sollte derjenige pH-Wert bestimmt werden, bei dem 140 maximale Mengen von Form II-DNA liefert, bzw. ob es solch einen Wert überhaupt gibt. Für diese Untersuchung wurde ein Bereich von 5.5 bis 9.0 abgedeckt. Die Plasmid-DNA wurde mit 140 bei Standard-Bedingungen inkubiert. Um zu sehen, ob der beobachtete Effekt (falls es einen gibt) durch das Bisamin 140 entsteht, wurde für jeden pH-Wert eine eigene Kontrolle angelegt. Schaut man sich das Ergebnis der Gel-Elektrophorese in *Abbildung 7-61* an, sieht man in den Kontrollen von pH 5.5 bis 6.5 beträchtliche Mengen von open-circle DNA, die allein durch den sauren pH hervorgerufen wurden, und eine Aussage über die Aktivität von 140 verhindern. Ab pH 7 bis 9 sieht man in den Kontrollen keinen nennenswerten Anteil mehr der open-circle Form. Allerdings sieht man bei diesen pH-Werten auch nicht mehr viel Spaltung in den Lanes, die 140 enthalten.



**Abbildung 7-61:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die bei verschiedenen pH-Werten mit 140 inkubiert wurde (variabler pH von 5.5 bis 9). Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I). Zusätzlich tritt in einigen Lanes auch noch lineare DNA auf.

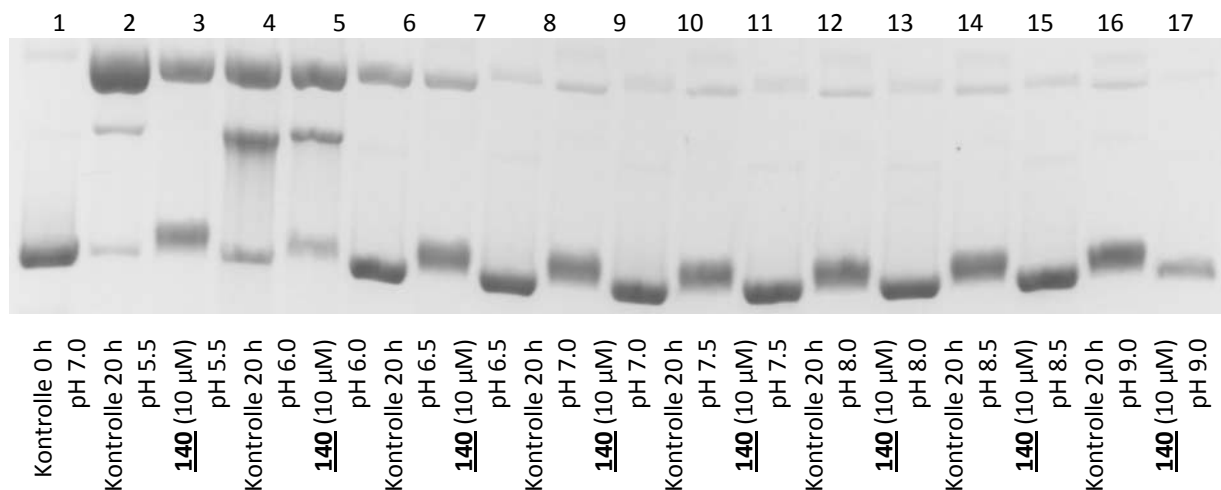
Dieses Experiment wurde wie üblich unter den gleichen Bedingungen zweimal wiederholt, um eine Bestätigung für die erhaltenen Werte zu bekommen.

Die eingesetzte Plasmid-DNA erweist sich wieder als instabil im pH-Bereich zwischen 5.5 und 6.5, denn von der supercoiled Form ist nach 20 h Inkubation kaum noch etwas nachweisbar.



**Abbildung 7-62:** Agarose-Gel (Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die erneut bei verschiedenen pH-Werten mit 140 inkubiert wurde (variabler pH von 5.5 bis 9). Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I). Wieder tritt in einigen Lanes auch lineare DNA auf.

Die zweite Reproduktion der pH-Experimente liefert hier keine neuen Erkenntnisse, denn im Wesentlichen werden die bereits bekannten Trends untermauert, wie man in *Abbildung 7-63* sehen kann:



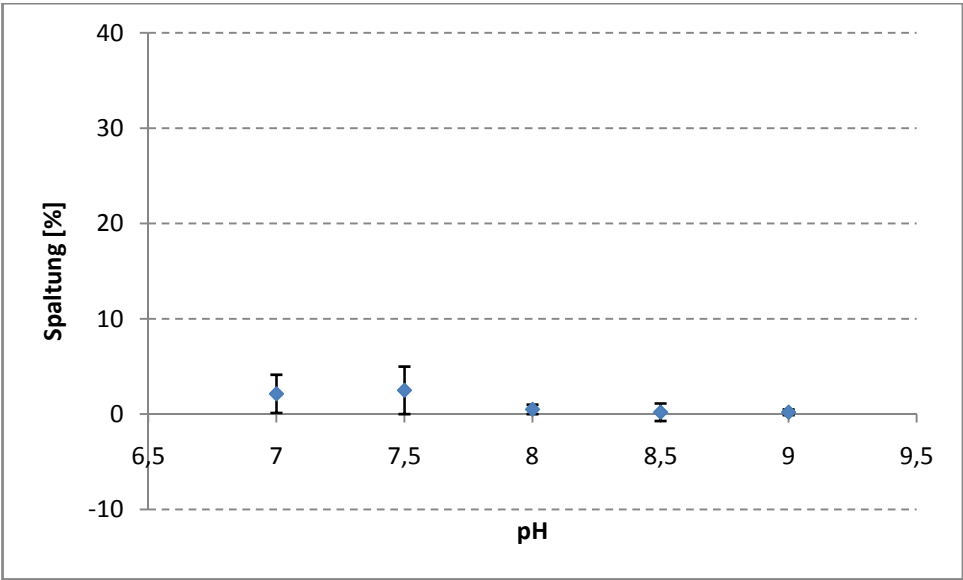
**Abbildung 7-63:** Agarose-Gel (zweite Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die erneut bei verschiedenen pH-Werten mit 140 inkubiert wurde (variabler pH von 5.5 bis 9). Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I). Wieder tritt in einigen Lanes auch lineare DNA auf.

Die quantitative Auswertung dieser drei Experimente ist übersichtlich in *Tabelle 7-22* dargestellt und lässt darauf schließen, dass **140** bei pH-Werten  $\geq 7.0$  annähernd inaktiv ist. Für saure pH-Werte lassen sich keine Aussagen über die Aktivität von **140** machen. Die erhaltenen Werte für den sauren pH-Bereich sind aufgrund des starken Abbaus der DNA nicht interpretierbar.

**Tabelle 7-22:** Quantifizierung der pH-abhängigen Umwandlung von supercoiled Plasmid-DNA in open-circle-DNA. Zusätzlich dazu sind die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

pH	Exp. 1 [%]	Exp. 2 [%]	Exp. 3 [%]	$\bar{\varnothing}$ [%]	$\sigma$ [%]
5.5	nicht auswertbar	nicht auswertbar	nicht auswertbar	-	-
6.0	nicht auswertbar	nicht auswertbar	nicht auswertbar	-	-
6.5	nicht auswertbar	nicht auswertbar	nicht auswertbar	-	-
7.0	4.5	2.3	-0.4	2.1	2.0
7.5	1.1	6.0	0.4	2.5	2.5
8.0	0.8	0.9	-0.2	0.5	0.5
8.5	0.8	0.9	-1.1	0.2	0.9
9.0	0.5	0.3	-0.2	0.2	0.3

Noch deutlicher wird die obige Aussage, wenn man die berechneten Mittelwerte in einer Grafik aufträgt:

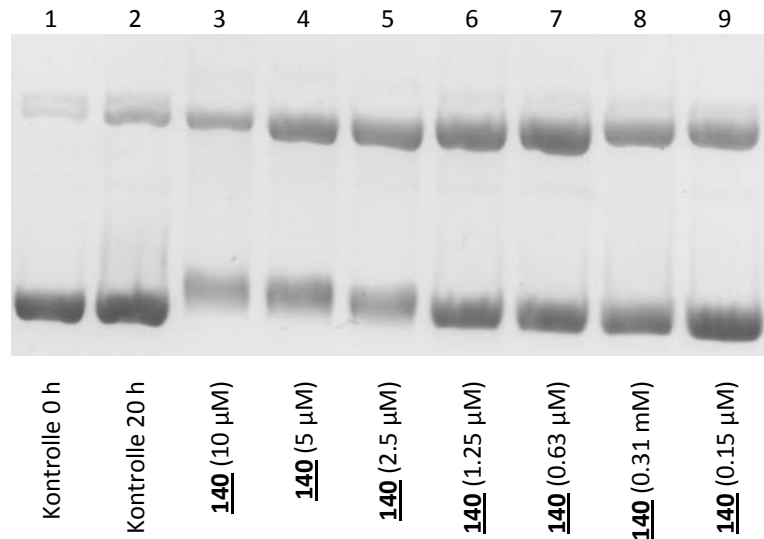


**Abbildung 7-64:** Graphische Darstellung der Ergebnisse aus *Tabelle 7-22*. Die Verbindung **140** erscheint hier ab einem pH-Wert von 7 annähernd inaktiv.

### 7.3.8.1 Konzentrationsabhängigkeit der Plasmid-Spaltung durch 140

In einem ersten Experiment wurde der Bereich zwischen 10 und 0.15  $\mu\text{M}$  untersucht. Wie auch an anderer Stelle wurde pUC19-Plasmid-DNA unter Standard-Bedingungen inkubiert, und anschließend auf einem Agarose-Gel analysiert.

Wie man *Abbildung 7-65* entnehmen kann, scheint 140 im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich (Lane 3 bis 9) aktiv zu sein.



**Abbildung 7-65:** Agarose-Gel-Elektrophorese von pUC19-Plasmid-DNA, die mit verschiedenen Konzentrationen von 140 inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-Form (Form II), unten supercoiled-Form (Form I).

Interessant ist auch der deutlich sichtbare Shift, der besonders in den Lanes 3 und 4 bei der supercoiled Form auftritt. Dies könnte bedeuten, dass der Polyamid-Teil von 140 an die *minor groove* der DNA bindet, und dadurch lokal Konformationsänderungen bewirkt, die zu einer Änderung der elektrophoretischen Laufeigenschaften führen.

Für eine genauere Bestimmung des Spalt-Maximums wurde das Gel elektronisch ausgewertet und die bestimmten Werte in *Tabelle 7-23* aufgelistet:

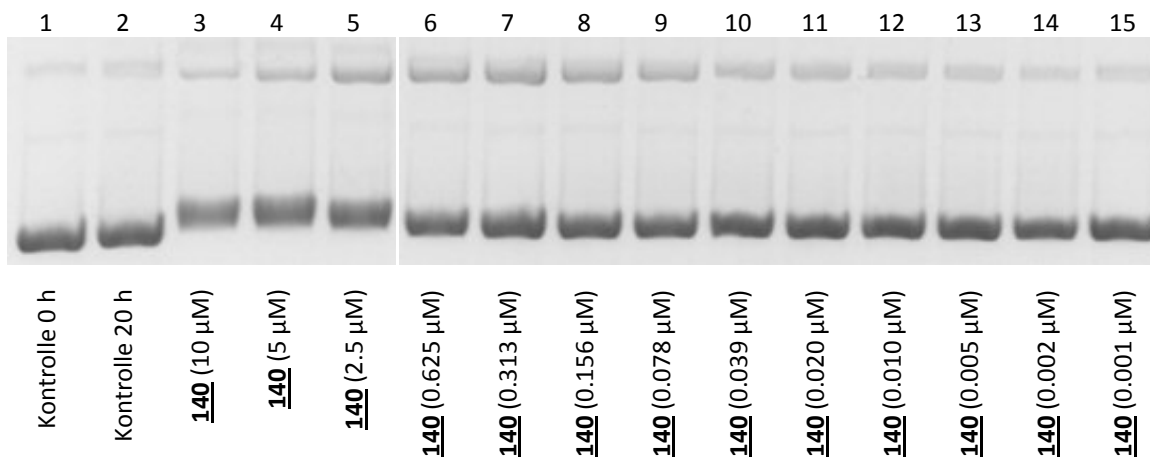
**Tabelle 7-23:** Quantifizierung der Umwandlung von supercoiled Plasmid-DNA in open-circle-DNA (oc).

Lane	Molekül	oc [%]	Lane	Molekül	oc [%]
1	Kontrolle 0 h	4.3	6	<u>140</u> (1.25 $\mu\text{M}$ )	40.5
2	Kontrolle 20 h	17.3	7	<u>140</u> (0.63 $\mu\text{M}$ )	44.3
3	<u>140</u> (10 $\mu\text{M}$ )	32.0	8	<u>140</u> (0.31 $\mu\text{M}$ )	35.3
4	<u>140</u> (5 $\mu\text{M}$ )	42.6	9	<u>140</u> (0.15 $\mu\text{M}$ )	30.2
5	<u>140</u> (2.5 $\mu\text{M}$ )	46.1			

Der Tabelle kann man entnehmen, dass das Maximum der Aktivität im Bereich zwischen 2.5 und 0.63  $\mu\text{M}$  liegen muss. Man kann aber auch sehen, dass mit 0.15  $\mu\text{M}$  **140** das Ende der Reaktivität noch nicht erreicht ist.

Um einerseits die minimale Konzentration von **140** für eine induzierte Spaltung und andererseits die Konzentration von **140**, die der maximalen Spaltung entspricht näher zu bestimmen, wurde das vorige Experiment wiederholt und der untersuchte Bereich auf 10 bis 0.001  $\mu\text{M}$  ausgedehnt.

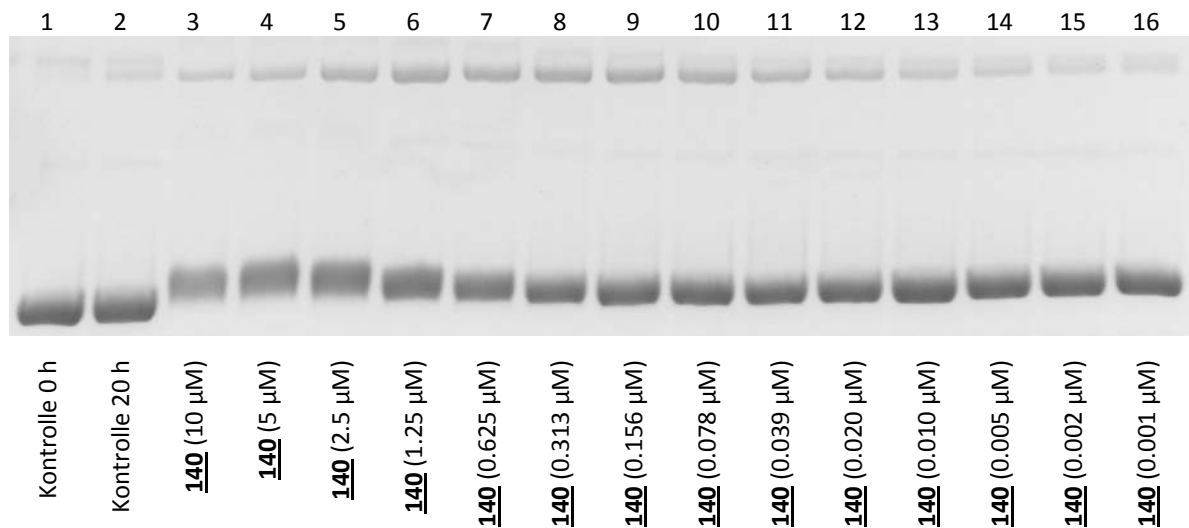
Betrachtet man die Kontrolle (Lane 2) in *Abbildung 7-66* fällt schnell auf, dass in diesem Experiment wesentlich weniger an Hintergrundreaktion abgelaufen ist als im Experiment zuvor. In den Lanes 3 bis 16 sind dann die verschiedenen Konzentrationen vom **140** aufgetragen.



**Abbildung 7-66:** Agarose-Gel-Elektrophorese von pUC19-Plasmid-DNA, die mit **140** inkubiert wurde. Der untersuchte Bereich erstreckt sich hier von 10  $\mu\text{M}$  bis 1 nM. Oben im Bild: open-circle-Form (Form II), unten supercoiled-Form (Form I).

Der oben getestete Konzentrationsbereich von **140** hat sich als weit genug erwiesen, um augenscheinlich sowohl das Minimum der Konzentration für einen Effekt als auch das Maximum der Spaltung zu ermitteln. Um die Aussagen aus dem vorangegangenen Abschnitt zu überprüfen, wurde eine Reproduktion durchgeführt, wobei alle Parameter unverändert übernommen wurden.

Man kann in der *Abbildung 7-67* erkennen, dass wieder ein Maximum durchlaufen wird, das zwischen 2.5 und 0.078  $\mu\text{M}$  liegt.



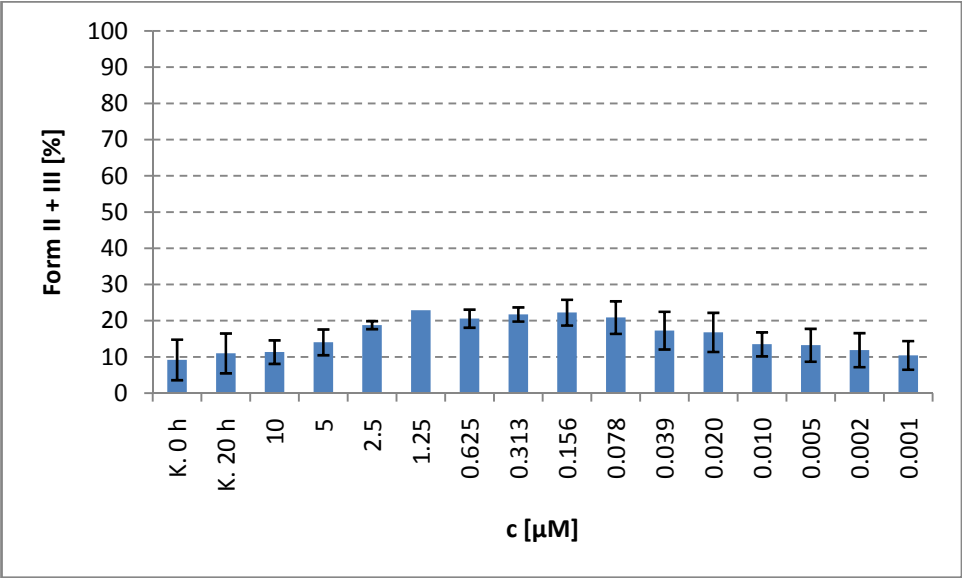
**Abbildung 7-67:** Agarose-Gel-Elektrophorese (Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die mit 140 inkubiert wurde. Der untersuchte Bereich erstreckt sich hier von 10 µM bis 1 nM. Oben im Bild: open-circle-Form (Form II), unten supercoiled-Form (Form I).

Die Auswertung der beiden Experimente ist in *Tabelle 7-24* gezeigt und enthält zusätzlich den Mittelwert und die Standardabweichung.

**Tabelle 7-24:** Übersicht über die experimentell ermittelten Spaltmengen, die errechneten Mittelwerte ( $\bar{\sigma}$ ) und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

<i>c</i> [µM]	1. Spaltung [%]	2. Spaltung [%]	$\bar{\sigma}$ [%]	$\sigma$ [%]
Kontrolle 0 h	3.6	14.8	9.2	5.6
Kontrolle 20 h	5.5	16.5	11.0	5.5
10	8.1	14.6	11.4	3.3
5	10.5	17.6	14.1	3.6
2.5	17.7	19.9	18.8	1.1
1.25	-	22.9	22.9	0.0
0.625	18.1	23.1	20.6	2.5
0.313	19.8	23.7	21.8	2.0
0.156	18.7	25.8	22.3	3.5
0.078	16.4	25.4	20.9	4.5
0.039	12.1	22.5	17.3	5.2
0.020	11.4	22.2	16.8	5.4
0.010	10.2	16.8	13.5	3.3
0.005	8.7	17.8	13.3	4.6
0.002	7.2	16.6	11.9	4.7
0.001	6.5	14.4	10.5	4.0

Den Trend des konzentrationsabhängigen Experiments kann man sehr gut in der *Abbildung 7-68* erkennen, und eine maximale Aktivität bei Konzentrationen zwischen 1.25 und 0.156 µM ablesen.



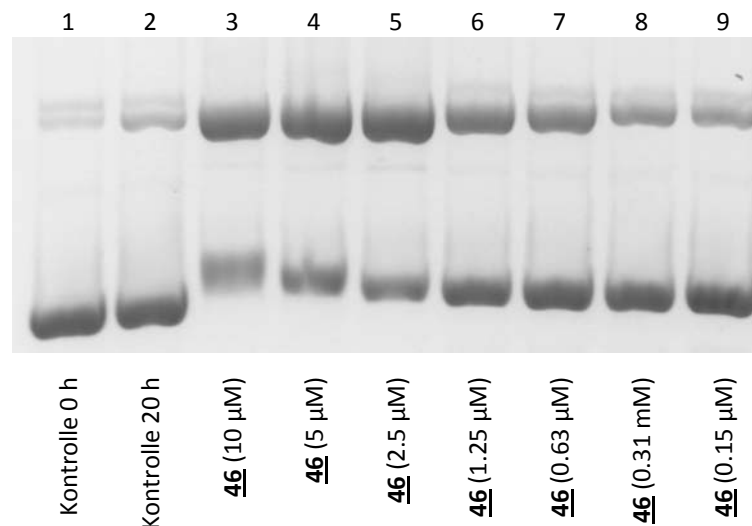
**Abbildung 7-68:** Grafische Darstellung der durch **140** induzierten Spaltmengen als Balkendiagramm für den Konzentrationsbereich von 10 μM bis 1 nM. Die Substanz zeigt signifikante Spaltung in Konzentrationen zwischen 1.25 und 0.156 μM.



### 7.3.9 Reaktion mit dem Polyamid-Bisguanidin **46**

Das Bisguanidin-Alkohol-Konjugat **46** ist das eigentliche Zielmolekül der gesamten Arbeit und wurde daher entsprechend intensiv untersucht. Zunächst wurde nach dem Konzentrationsbereich gesucht, in dem die Substanz aktiv ist, und für den Start orientierte man sich an den Konzentrationen, die auch anfangs für **140** verwendet worden waren. Die experimentellen Bedingungen wurden für die Inkubation mit **46** ebenso konstant gehalten.

Die Kontrolle (*Abbildung 7-69*, Lane 2), die bekannter Weise von besonderem Interesse ist, zeigt hier nur sehr wenig open-circle-DNA. Die Lanes 3 bis 9 zeigen absteigende Konzentrationen von **46**, wobei für jede einzelne Probe ein Effekt vorhanden ist. Interessant zu erwähnen ist hier noch der deutlich ausgeprägte Shift der supercoiled-DNA bei hohen Konzentrationen von **46**.

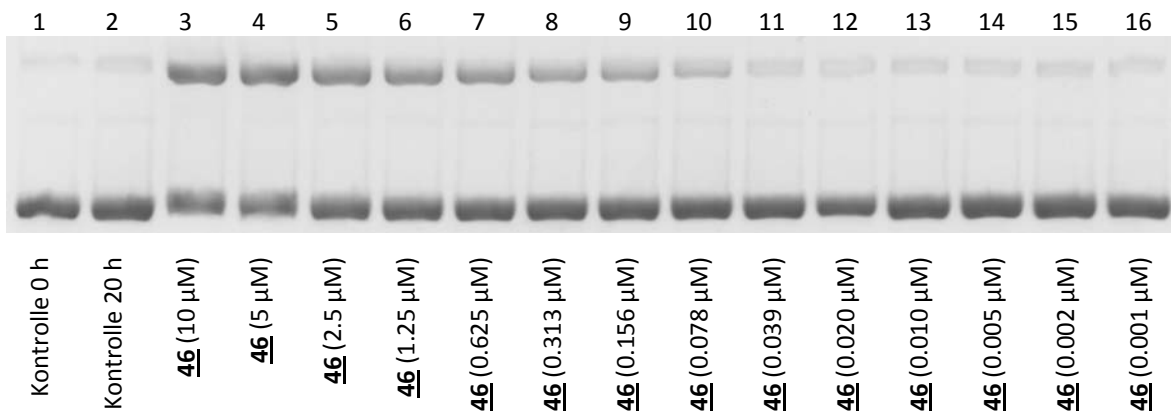


**Abbildung 7-69:** Agarose-Gel-Elektrophorese (Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die mit **46** (im Bereich von 10 bis 0.15 µM) inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-Form (Form II), unten supercoiled-Form (Form I).

Man kann sehr gut verfolgen, wie die Aktivität von **46** mit steigender Konzentration zunimmt. Ein Effekt durch **46** kann durchaus schon bei einer Konzentration von 150 nM beobachtet werden.

Die bisherigen Ergebnisse ermutigten zu einer Ausdehnung des untersuchten Konzentrationsbereiches.

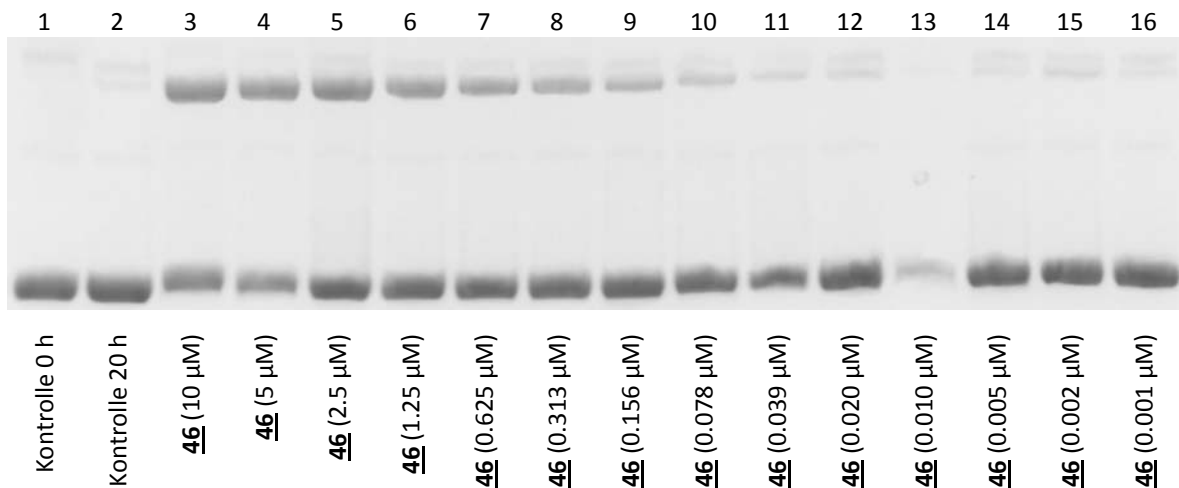
In dem folgenden Experiment (siehe *Abbildung 7-70*) wurde die Spaltaktivität von **46** dann im Bereich von 10 µM bis 1 nM bestimmt:



**Abbildung 7-70:** Agarose-Gel-Elektrophorese von pUC19-Plasmid-DNA, die mit 46 (im erweiterten Konzentrationsbereich von 10  $\mu$ M bis 1 nM) inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-Form (Form II), unten supercoiled-Form (Form I).

Der Abbildung kann man entnehmen, dass die im vorangegangenen Experiment getesteten 150 nM schon recht nah an der Mindestkonzentration von 46 lagen, um einen deutlichen Effekt sehen zu können.

Wie bisher ist auch hier eine Doppelbestimmung durchgeführt worden, um die bestimmten Werte weiter abzusichern. Für die Reproduktion wurde an den experimentellen Parametern nichts verändert:



**Abbildung 7-71:** Agarose-Gel-Elektrophorese (Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die mit 46 (im Konzentrationsbereich von 10  $\mu$ M bis 1 nM) inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-Form (Form II), unten supercoiled-Form (Form I).

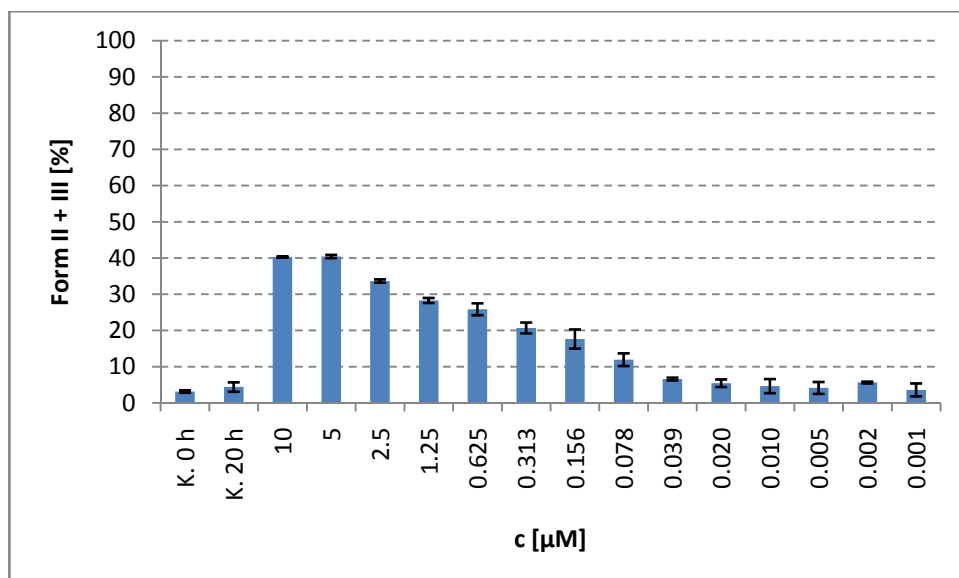
Die Analytik weist schon auf den ersten Blick eine starke Ähnlichkeit zur ersten Versuchsreihe auf. Man kann qualitativ wie zuvor einen Trend in der Menge der Spaltung erkennen.

In der Zusammenstellung in *Tabelle 7-25* kann man eine sehr gute Übereinstimmung der beiden Experimente erkennen.

**Tabelle 7-25:** Übersicht über die experimentell ermittelten Spaltmengen, die errechneten Mittelwerte ( $\bar{\sigma}$ ) und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

$c [\mu\text{M}]$	1. Exp. [%]	2. Exp. [%]	$\bar{\sigma}$ [%]	$\sigma$ [%]
Kontrolle 0 h	3.5	2.8	3.2	0.4
Kontrolle 20 h	5.7	3.1	4.4	1.3
10	40.1	40.5	40.3	0.2
5	40.0	40.9	40.5	0.4
2.5	33.2	34.1	33.7	0.4
1.25	29.0	27.6	28.3	0.7
0.625	27.5	24.2	25.9	1.6
0.313	22.2	19.2	20.7	1.5
0.156	20.3	15.0	17.7	2.7
0.078	13.7	10.2	12.0	1.8
0.039	7.0	6.2	6.6	0.4
0.020	6.5	4.4	5.5	1.1
0.010	6.6	2.7	4.7	2.0
0.005	5.8	2.5	4.2	1.7
0.002	5.9	5.4	5.7	0.3
0.001	5.4	1.8	3.6	1.8

Die Zunahme der open-circle-DNA, die durch die zunehmende Konzentration von **46** induziert wird, lässt sich sehr gut aus der grafischen Darstellung der Mittelwerte in *Abbildung 7-72* ablesen. Die Minimal-Konzentration, bei der noch signifikante Spaltung beobachtet werden kann, liegt bei 78 nM **46**.

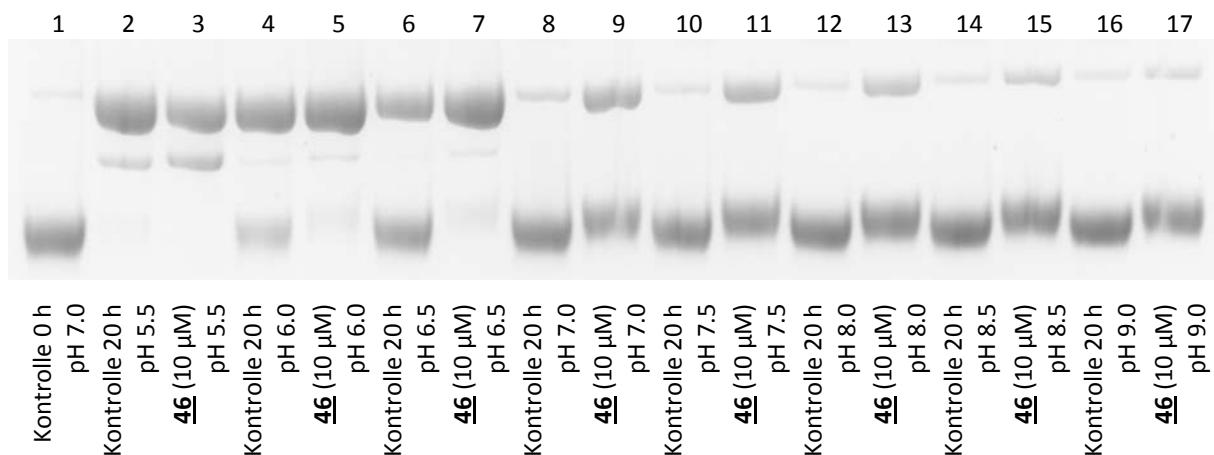


**Abbildung 7-72:** Grafische Darstellung der durch **46** induzierten Spaltmengen als Balkendiagramm für den Konzentrationsbereich von 10  $\mu\text{M}$  bis 1 nM. Die Substanz zeigt signifikante Spaltung in Konzentrationen zwischen 10 und 0.078  $\mu\text{M}$ .

### 7.3.9.1 pH-Abhängigkeit der Plasmid-Spaltung

Für eine erste Testreihe wurde pUC19-Plasmid-DNA mit 10  $\mu\text{M}$  **46** bei Standard-Bedingungen inkubiert, wobei der HEPES-Puffer wieder auf die entsprechenden pH-Werte zwischen 5.5 bis 9 eingestellt wurde.

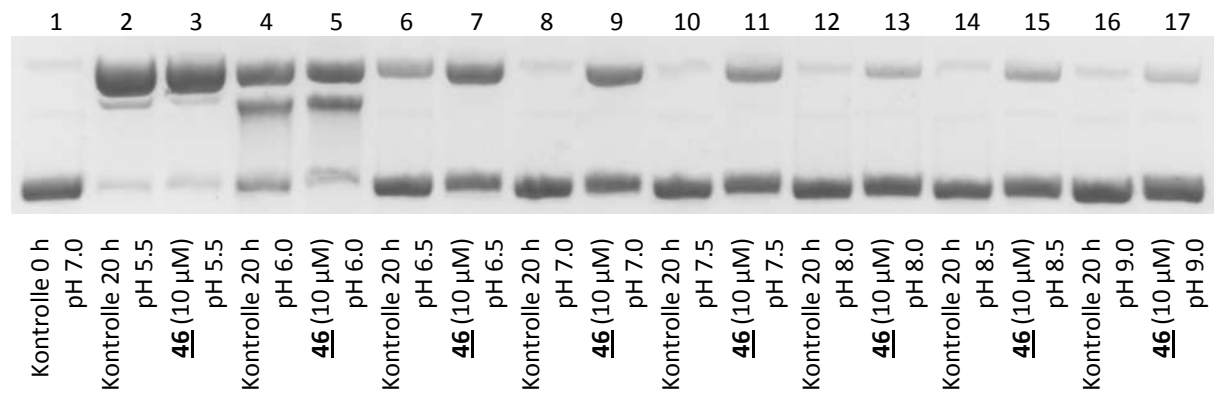
Die elektrophoretische Analytik des ersten Experiments ist in *Abbildung 7-73* dargestellt, die wie schon in den anderen pH-abhängigen Untersuchungen in den Kontrollen einen starken Abbau der DNA bei saurem pH zeigt, der in Lane 2 sogar quantitativ ist. Ab pH 7 bis 9 liegt die Menge der gebildeten open-circle-DNA in einem akzeptablen Rahmen, wobei man dem Gel aber entnehmen kann, dass die Aktivität von **46** mit steigendem pH abnimmt.



**Abbildung 7-73:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die bei verschiedenen pH-Werten mit **46** inkubiert wurde (variabler pH von 5.5 bis 9). Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I). Dazwischen die lineare DNA (Form III).

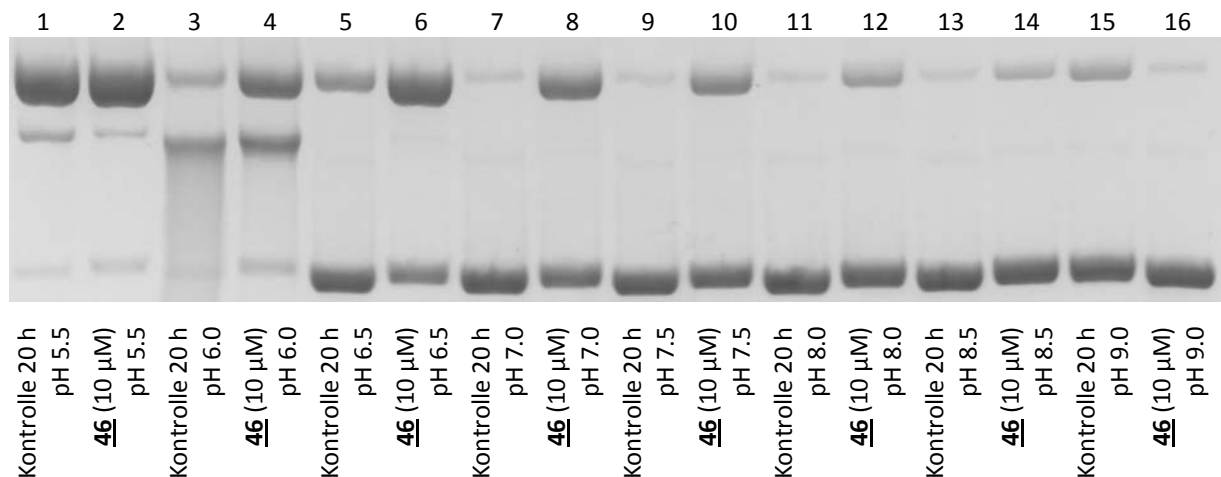
Betrachtet man die obige Abbildung etwas genauer, erkennt man für den sauren Bereich der Testreihe neben der open-circle-DNA sogar lineare DNA, die vor allem in den Lanes 2 und 3 hervor tritt. Trotz der z.T. vollständigen Zerstörung der Plasmid-DNA bei saurem pH kann man zumindest für den Bereich von 7 bis 9 einen Trend erkennen, bei dem die Menge der Spaltung immer weiter nachlässt.

Auch dieses Experiment wurde unter gleich bleibenden Bedingungen wiederholt (siehe *Abbildung 7-74*), und wieder kann man bei saurem pH eine annähernd vollständige Umwandlung der Plasmid-DNA in die open-circle-Form feststellen. Ab pH 7 bis 9 stellt sich wieder die bereits bekannte Abnahme in der Spaltaktivität von **46** ein:



**Abbildung 7-74:** Agarose-Gel (Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die bei verschiedenen pH-Werten mit 46 inkubiert wurde (variabler pH von 5.5 bis 9). Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I). Dazwischen die lineare DNA.

Die zweite Wiederholung (gezeigt in *Abbildung 7-75*) bestätigt die qualitative Beobachtung der beiden anderen Experimente. Wieder wird die DNA bei saurem pH annähernd vollständig in die open-circle- bzw. lineare Form überführt, und ebenso nimmt die Spaltmenge durch 46 augenscheinlich mit zunehmendem pH ab. Besser als in den Gelen zuvor kann man hier vor allem an dem Schatten in Lane 3 erkennen, dass die lineare DNA noch weiter fragmentiert wird und dabei DNA-Stücke aller Längen (< 2686 bp) entstehen.



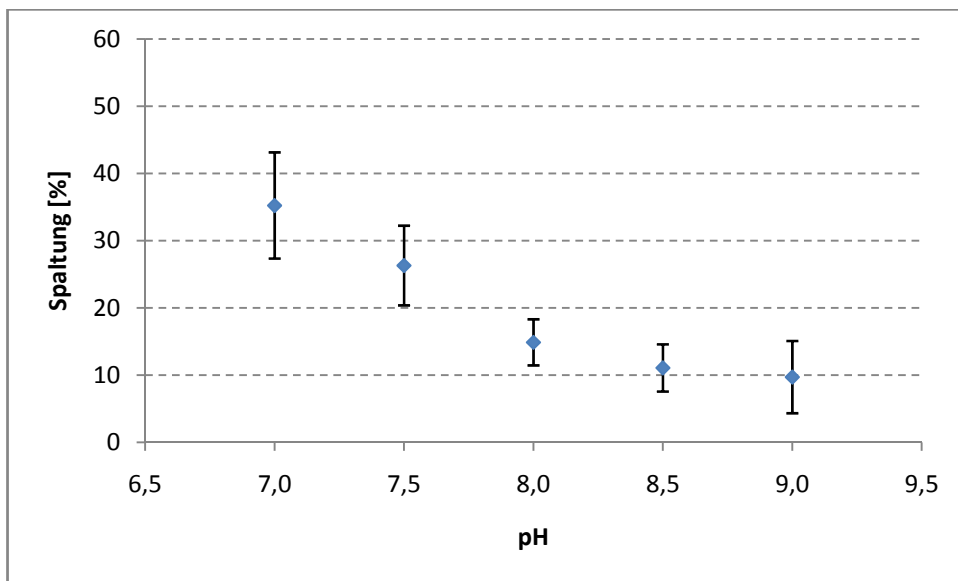
**Abbildung 7-75:** Agarose-Gel (zweite Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die bei verschiedenen pH-Werten mit 46 inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I). Dazwischen die lineare DNA (Form III).

Die *Tabelle 7-22* zeigt übersichtlich die Auswertung der drei Experimente inklusive Mittelwert und Standardabweichung:

**Tabelle 7-26:** Quantifizierung der drei pH-abhängigen Spalt-Experimente von supercoiled pUC19-Plasmid-DNA. Zusätzlich sind der berechnete Mittelwert und die Standardabweichung angegeben.

pH	Exp. 1 [%]	Exp. 2 [%]	Exp. 3 [%]	$\bar{\sigma}$ [%]	$\sigma$ [%]
5.5	nicht auswertbar	nicht auswertbar	nicht auswertbar	-	-
6.0	nicht auswertbar	nicht auswertbar	nicht auswertbar	-	-
6.5	nicht auswertbar	nicht auswertbar	nicht auswertbar	-	-
7.0	36.0	44.5	25.2	35.2	7.9
7.5	26.0	33.7	19.2	26.3	5.9
8.0	12.1	19.7	12.8	14.9	3.4
8.5	15.7	10.3	7.2	11.1	3.5
9.0	8.5	16.8	3.8	9.7	5.4

Wie mehrfach gezeigt wurde, ist die DNA im Bereich von 5.5 bis 6.5 sehr labil und macht so eine Aussage über Spalt-Effizienz unmöglich. Ab pH 7 nimmt die Menge der open-circle-DNA mit zunehmendem pH immer weiter ab. Dies könnte dafür sprechen, dass der Stickstoff im Linker von **46** deprotoniert wird, und so deutlich an Affinität zur DNA verliert.



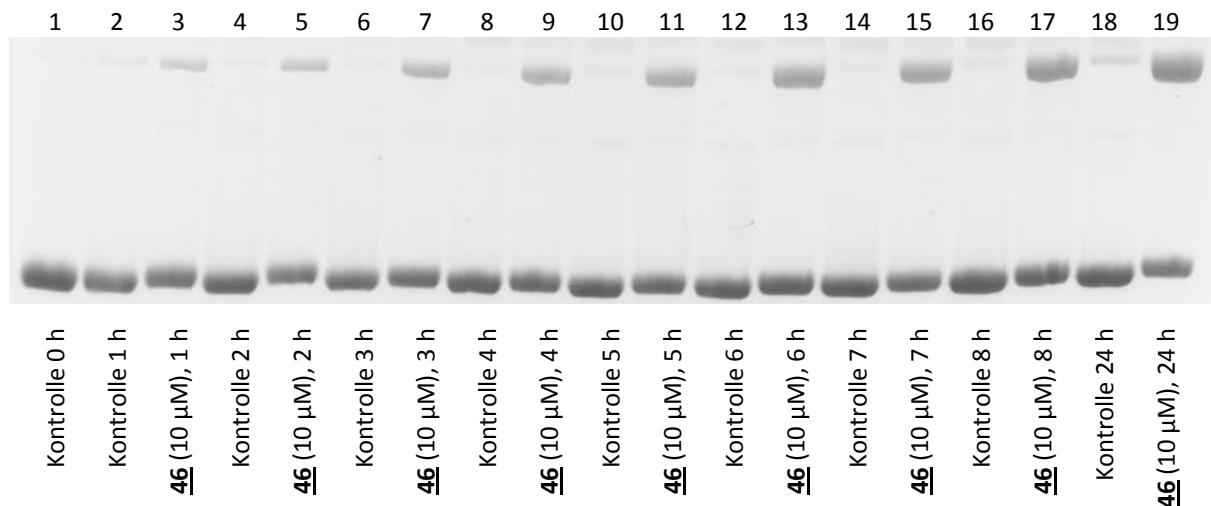
**Abbildung 7-76:** Graphische Darstellung der Ergebnisse aus *Tabelle 7-26*. Man erkennt eine deutliche Abnahme der gebildeten Form II-DNA mit zunehmendem pH.

### 7.3.9.2 Kurzzeit-Kinetik

Zur genaueren Charakterisierung von **46** ist bisher einerseits die Konzentration und andererseits der pH variiert worden. Im nun vorliegenden Abschnitt soll der Einfluss der Zeit auf die Menge der gebildeten open-circle-DNA näher beleuchtet werden.

Hierzu wurde wie auch schon zuvor pUC19-Plasmid-DNA (Standard-Bedingungen) mit **46** inkubiert, wobei in definierten Zeitabständen (hier jeweils eine Stunde) Proben zur Analyse entnommen wurden.

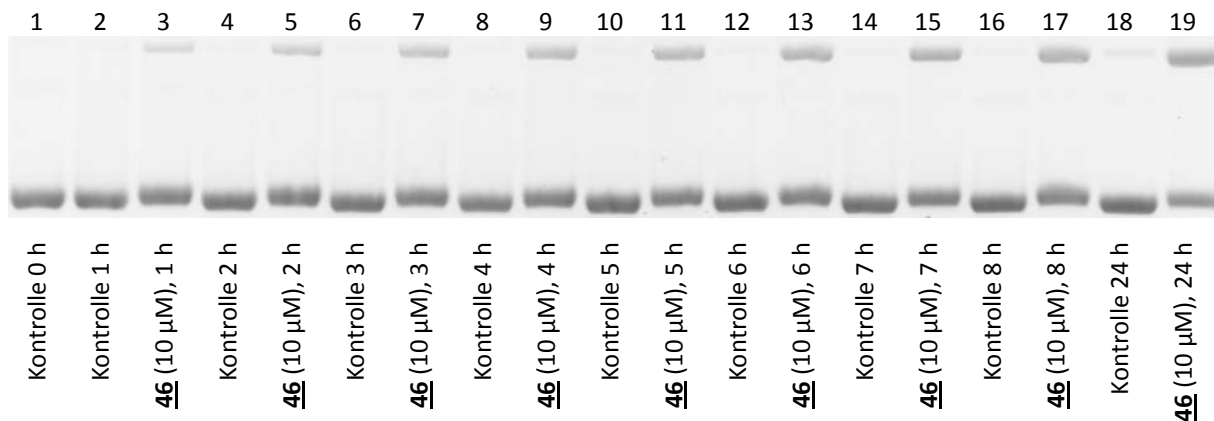
Die *Abbildung 7-77* zeigt deutlich ein stetiges Anwachsen von open-circle-DNA über den beobachteten Zeitraum von 8 Stunden. Da während dieser Zeit -und auch nach der Abschlusskontrolle nach 24 h- annähernd keine Hintergrundreaktion zu erkennen ist, lässt sich dieses Experiment leicht auswerten.



**Abbildung 7-77:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die mit **46** inkubiert wurde. Im Abstand von je einer Stunde wurde eine Probe entnommen, um eine Kurzzeit-Kinetik erstellen zu können. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

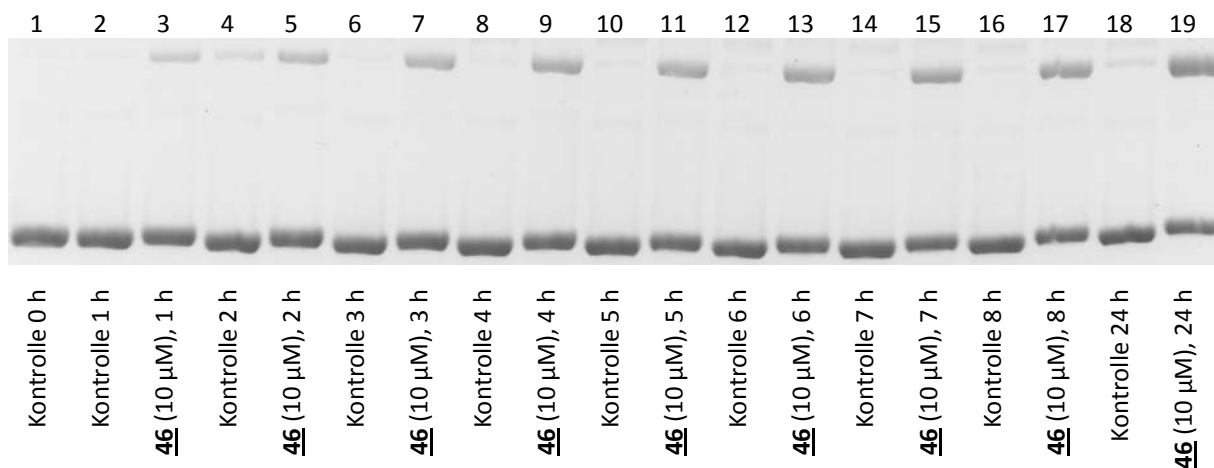
Wie üblich ist auch diese Kurzzeit-Kinetik unter unveränderten Bedingungen nochmals durchgeführt worden, um eine Bestätigung für die bereits experimentell gefundenen Daten zu bekommen.

Wieder kann man eine langsam anwachsende Menge von open-circle-DNA in der Testreihe beobachten, wobei der Zuwachs hier insgesamt geringer erscheint. Dies korreliert mit einer langsameren Reaktionsgeschwindigkeit.



**Abbildung 7-78:** Agarose-Gel (Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die mit **46** inkubiert wurde. Im Abstand von je einer Stunde wurde eine Probe entnommen, um eine Kurzzeit-Kinetik erstellen zu können. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

Für eine statistisch bessere Aussage ist die Kurzzeit-Kinetik ein zweites Mal wiederholt worden. Die Gel-Analytik unterscheidet sich optisch nicht wesentlich von den beiden anderen Analysen und reproduziert die bekannten Daten in guter Näherung.



**Abbildung 7-79:** Agarose-Gel (zweite Reproduktion) von pUC19-Plasmid-DNA, die mit **46** inkubiert wurde. Im Abstand von je einer Stunde wurde eine Probe entnommen, um eine Kurzzeit-Kinetik erstellen zu können. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

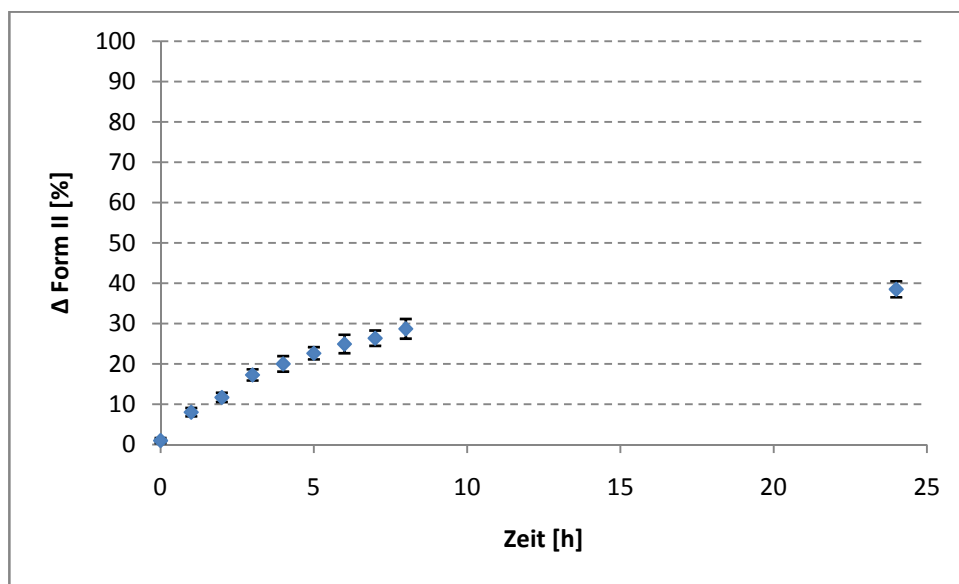
Die Gele sind dann ausgewertet und aus den entsprechenden Daten Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet worden, die in *Tabelle 7-27* aufgeführt sind. Letztere bewegen sich zwischen 1.0 und 2.4 %, und bezeugen so eine erstaunliche Konsistenz der Daten.



**Tabelle 7-27:** Übersicht über die experimentell ermittelten Spaltmengen, die errechneten Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

Zeit [h]	Exp. 1 [%]	Exp. 2 [%]	Exp. 3 [%]	$\bar{x}$ [%]	$\sigma$ [%]
1	7.4	7.2	9.5	8.0	1.0
2	13.0	11.9	10.2	11.7	1.2
3	18.3	15.3	18.2	17.3	1.4
4	19.9	17.7	22.4	20.0	1.9
5	23.9	20.5	23.5	22.6	1.5
6	27.6	22.0	25.2	24.9	2.3
7	28.0	23.7	27.4	26.4	1.9
8	31.4	25.5	29.2	28.7	2.4
24	40.1	35.7	39.7	38.5	2.0

Die berechneten Mittelwerte sind in der Grafik unten dargestellt, und verdeutlichen nochmals den Trend der Reaktion. Ebenfalls mit eingetragen sind die Standardabweichungen als Fehlerbalken.

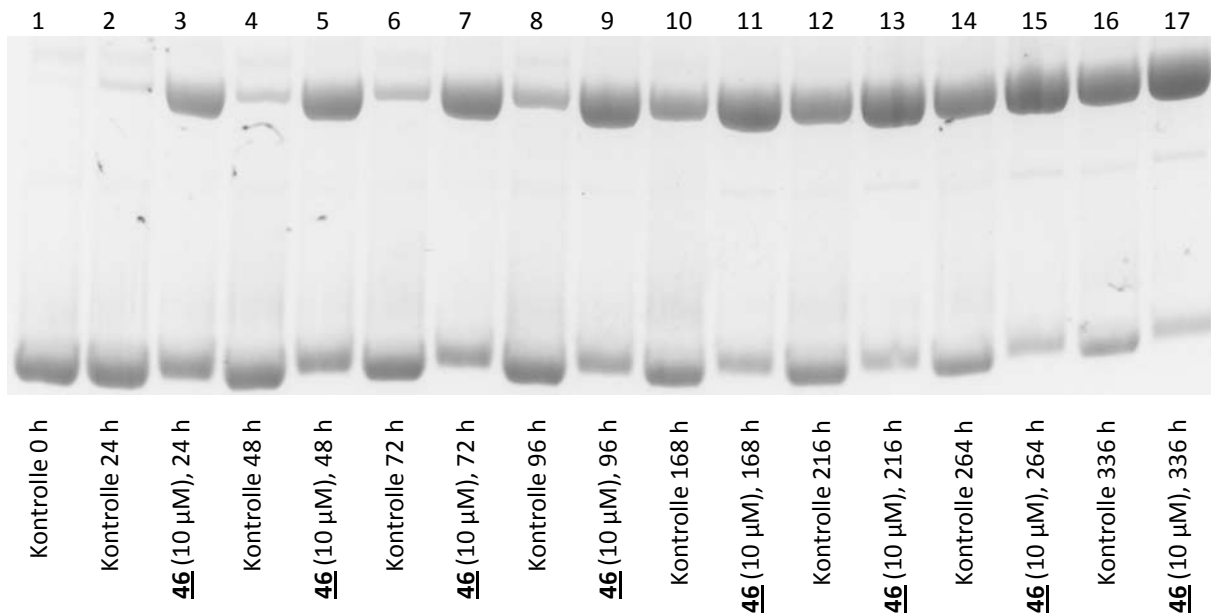


**Abbildung 7-80:** Graphische Darstellung der errechneten Mittelwerte (aus 3 Experimenten) der Kurzzeit-Kinetik von 46. Mit eingetragen ist die Standardabweichung als schwarze Fehlerbalken.

### 7.3.9.3 Langzeit-Kinetik

Neben der Kurzzeit-Kinetik aus dem vorangegangenen Kapitel wurde auch noch eine Kinetik über einen wesentlich längeren Zeitraum (hier 335 Stunden) angefertigt<sup>[XVII]</sup>.

Die *Abbildung 7-81* zeigt das Ergebnis der Kinetik, in man eine kontinuierliche Zunahme der Form II-DNA für die Kontrollen erkennen kann. Dieser Befund macht eine Auswertung über den hier betrachteten Zeitraum schwierig.



**Abbildung 7-81:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die mit **46** inkubiert wurde (pH 7). Im Abstand von je ein bis drei Tagen wurde eine Probe entnommen, um eine Langzeit-Kinetik erstellen zu können. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I). In der Analytik ist lineare DNA nur sehr schwach zu erkennen.

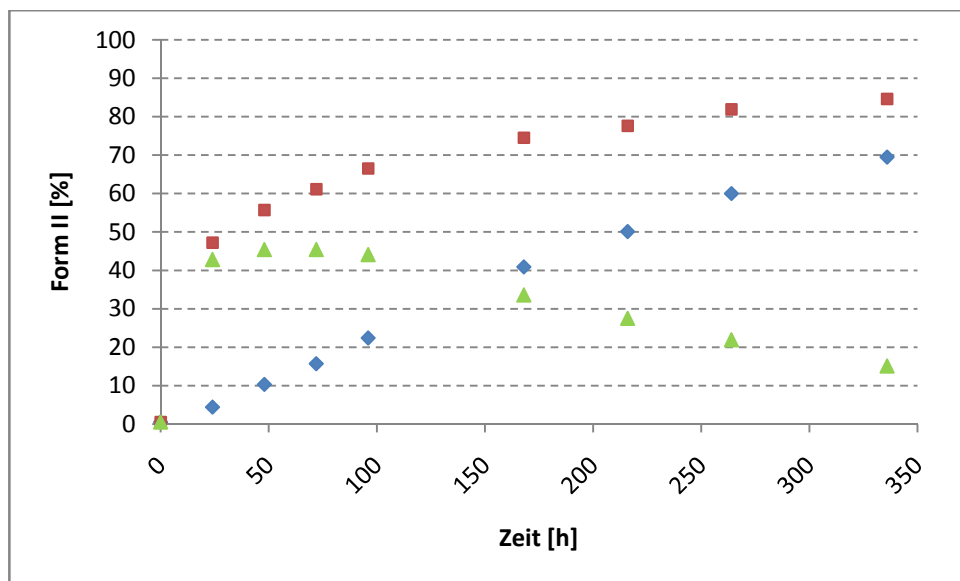
Besonders deutlich wird dies, wenn man sich die quantifizierten Werte in *Tabelle 7-28* anschaut. Die Hintergrundreaktion steigt bis zum Ende der Kinetik auf annähernd 70 % an, und schon nach 4 Tagen erreicht der Wert problematische 23 %.

<sup>XVII</sup> Zusätzlich ist auch eine Kinetik bei pH 6.5 durchgeführt worden (hier nicht gezeigt), die aber durch die starke Hintergrund-Reaktion bei diesem pH keine zuverlässige Aussage zulässt.

**Tabelle 7-28:** Quantifizierung der zeit-abhängigen Umwandlung von supercoiled Plasmid-DNA in open-circle-DNA (oc). Die Spalte „oc“ steht hierbei für die Summe von open-circle und -falls vorhanden- linearer DNA. In der Spalte „ $\Delta$ “ ist die Differenz von Kontrolle und der entsprechenden mit **46** inkubierten Probe eingetragen.

t [h]	Lane	Molekül	oc [%]	Lane	Molekül	oc [%]	$\Delta$ [%]
0	1	Kontrolle	0.5				
24	2	Kontrolle	4.4	10	<b>46</b> (10 $\mu$ M)	47.2	42.8
48	3	Kontrolle	10.3	11	<b>46</b> (10 $\mu$ M)	55.7	45.4
72	4	Kontrolle	15.7	12	<b>46</b> (10 $\mu$ M)	61.1	45.4
96	5	Kontrolle	22.4	13	<b>46</b> (10 $\mu$ M)	66.5	44.1
168	6	Kontrolle	40.9	14	<b>46</b> (10 $\mu$ M)	74.5	33.6
216	7	Kontrolle	50.1	15	<b>46</b> (10 $\mu$ M)	77.6	27.5
264	8	Kontrolle	60.0	16	<b>46</b> (10 $\mu$ M)	81.9	21.9
336	9	Kontrolle	69.5	17	<b>46</b> (10 $\mu$ M)	84.6	15.1

Schaut man sich das Experiment über die kompletten 336 Stunden an (siehe dazu *Abbildung 7-82*), erscheint der Effekt durch **46** als rückläufig (grüne Dreiecke), sobald man den Hintergrund (blaue Rauten) von der Gesamtsplung (rote Quadrate) subtrahiert hat. Man kann aus der Grafik ablesen, dass dieser Trend schon ab 72 h einsetzt.



**Abbildung 7-82:** Graphische Darstellung der Ergebnisse aus *Tabelle 7-28*. Die blauen Rauten zeigen den Trend der Hintergrund-Reaktion an, während die roten Quadrate für die Summe aus Hintergrund und Spalteffekt steht. Die grünen Dreiecke steht für die Differenz aus Gesamtsplung abzüglich Hintergrund (= „ $\Delta$ “).

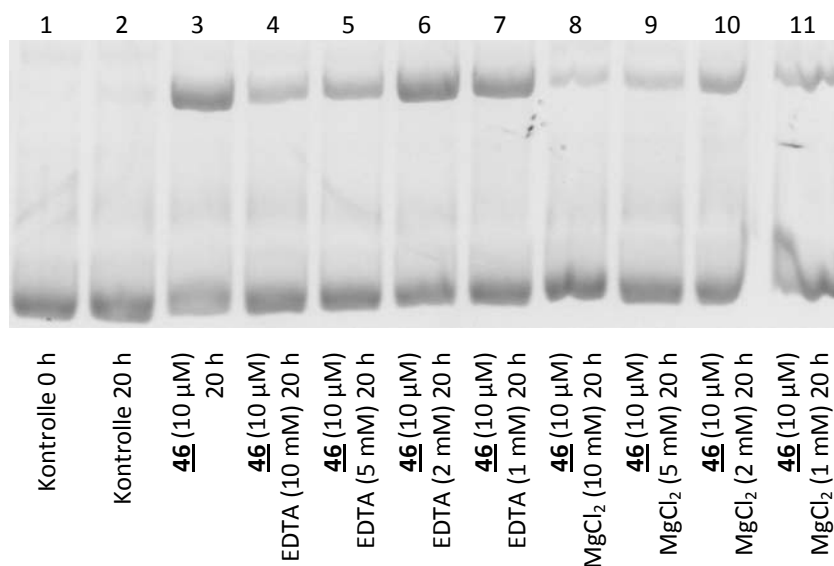
Vergleichend mit Kapitel 7.3.9.2 kann man sagen, dass eine Kinetik nur für kurze Zeiträume sinnvoll ist.

#### 7.3.9.4 Einfluss von Metall-Ionen auf die DNA-Spaltung

Wie auch schon bei den Molekülen **45** und **95** sollte auch bei **46** untersucht werden, wie sich die An- bzw. Abwesenheit von Metall-Ionen bei den Spalt-Experimenten bemerkbar macht. Dazu wurde pUC19-Plasmid-DNA in Anwesenheit von EDTA oder  $\text{MgCl}_2$  in je 4 verschiedenen Konzentrationen mit **46** inkubiert.

In der *Abbildung 7-83* sieht man zunächst die Kontrollen (Lane 1 bis 3), gefolgt von 4 Proben, in denen zusammen mit **46** zwischen 1 und 10 mM EDTA anwesend war. Die letzten 4 Lanes zeigen **46** mit absteigenden Konzentrationen von  $\text{MgCl}_2$ .

Während die ersten beiden Kontrollen annähernd keine open-circle-DNA zeigen, sieht man in Lane 3 die normale durch **46** induzierte Spaltung, die man erhält, wenn nichts anderes neben der Verbindung anwesend ist. Ab Lane 4 kann man erkennen, dass die Spaltmenge bei hohen Konzentrationen von EDTA stark abnimmt, um dann wieder anzusteigen, wenn man die Menge von EDTA reduziert. Im Gegensatz dazu scheint  $\text{MgCl}_2$  eher einen inhibitorischen als einen aktivierenden Einfluss auf die Spaltung auszuüben, wie die letzten 4 Lanes anzeigen.

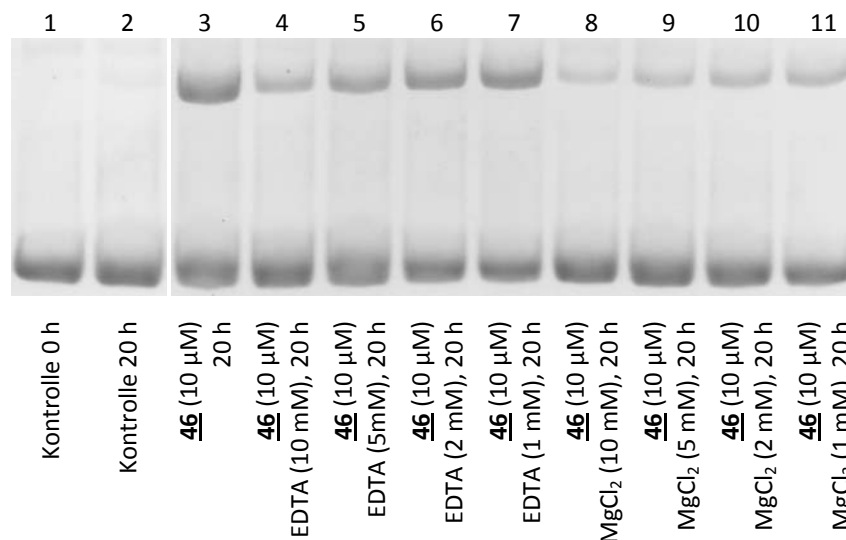


**Abbildung 7-83:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von EDTA bzw.  $\text{MgCl}_2$  mit **46** inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

Im Falle von EDTA -welches bei 10 mM im tausendfachen Überschuss bezüglich **46** vorhanden ist- wäre die Verminderung dadurch zu erklären, dass der Chelator als negativ geladenes Molekül mit positiven Ladungen wechselwirken kann, wie sie eben in **46** vorhanden sind. Damit würde die Attraktion zwischen **46** und der Plasmid-DNA stark gestört, was zur Abnahme der Spaltmenge führt.

Solch eine elektrostatische Wechselwirkung ist eben auch bei Zugabe von  $\text{MgCl}_2$  möglich, da das Mg als Dikation -welches ebenso im hohen Überschuss vorliegt- mit den Phosphaten der DNA interagiert und die Ladungen dort neutralisiert. Dies führt dann dazu, dass der Polyamid-Teil nicht mehr oder nur begrenzt an die DNA binden kann.

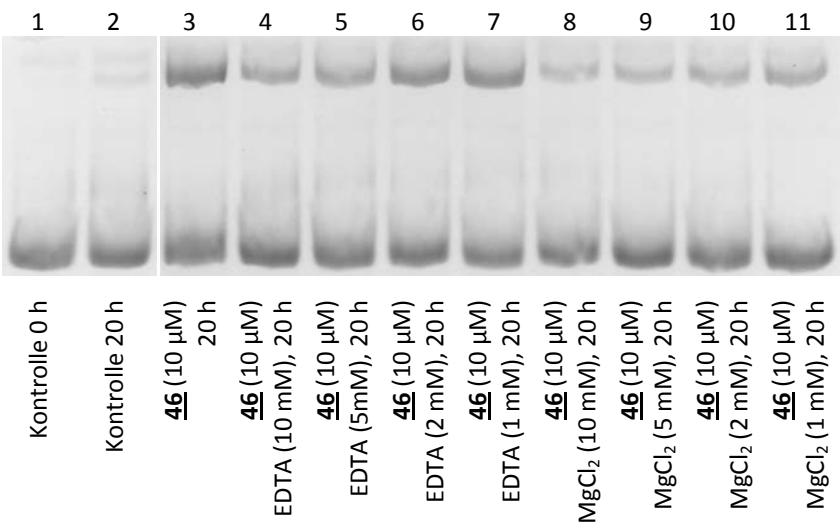
Dieses Experiment wurde dann zur Bestätigung der Daten nochmals durchgeführt. Die Analytik in *Abbildung 7-84* sieht der aus dem vorangegangenen Experiment recht ähnlich.



**Abbildung 7-84:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von EDTA bzw.  $\text{MgCl}_2$  mit **46** inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

Wieder kann man bei zunehmender Konzentration von EDTA einen Abfall in der Aktivität von **46** beobachten, während die Menge der open-circle-DNA bei Anwesenheit von  $\text{MgCl}_2$  beträchtlich unterdrückt wird.

Eine zweite Reproduktion ist in *Abbildung 7-85* gezeigt, und bestätigt bei qualitativer Betrachtung die bisherigen Erkenntnisse.



**Abbildung 7-85:** Agarose-Gel von pUC19-Plasmid-DNA, die unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von EDTA bzw.  $\text{MgCl}_2$  mit **46** inkubiert wurde. Oben im Bild: open-circle-DNA (Form II), unten supercoiled-DNA (Form I).

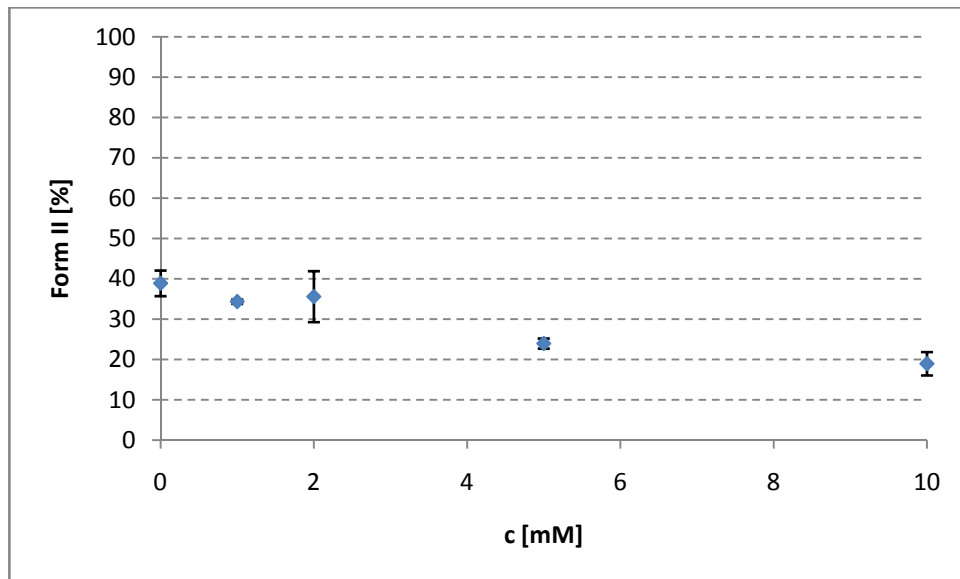
Zusammenfassend sind in *Tabelle 7-29* zunächst alle Daten für die Experimente in Anwesenheit von EDTA aufgeführt:

**Tabelle 7-29:** Übersicht über die experimentell ermittelten Spaltmengen für die Inkubation mit EDTA, die errechneten Mittelwerte ( $\varnothing$ ) und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

EDTA [mM]	Exp. 1 [%]	Exp. 2 [%]	Exp. 3 [%]	$\varnothing$ [%]	$\sigma$ [%]
0	43.3	35.9	37.5	38.9	3.2
1	34.2	33.8	35.1	34.4	0.5
2	44.5	30.5	31.8	35.6	6.3
5	25.0	22.2	24.7	24.0	1.3
10	19.0	15.4	22.5	19.0	2.9

In der Spalte, die die Mittelwerte enthält, kann man sehr schön den Einfluss des zugegebenen EDTAs erkennen, denn die gebildete Menge von open-circle-DNA verringert sich immer weiter mit zunehmender EDTA-Konzentration. Bei 10 mM EDTA erreicht die Menge der Form II-DNA mit 19.0 % gerade noch die Hälfte des Wertes, der bei Abwesenheit von EDTA erreicht wird. Gerade bei größeren Konzentrationen von EDTA ist eine erhöhte Wahrscheinlichkeit gegeben, dass **46** mit EDTA ein Ionenpaar bildet, und so der Spaltreaktion entzogen wird.

Interessant ist hierzu auch die *Abbildung 7-86*, die nochmals den Trend des EDTA-Einflusses grafisch veranschaulicht:



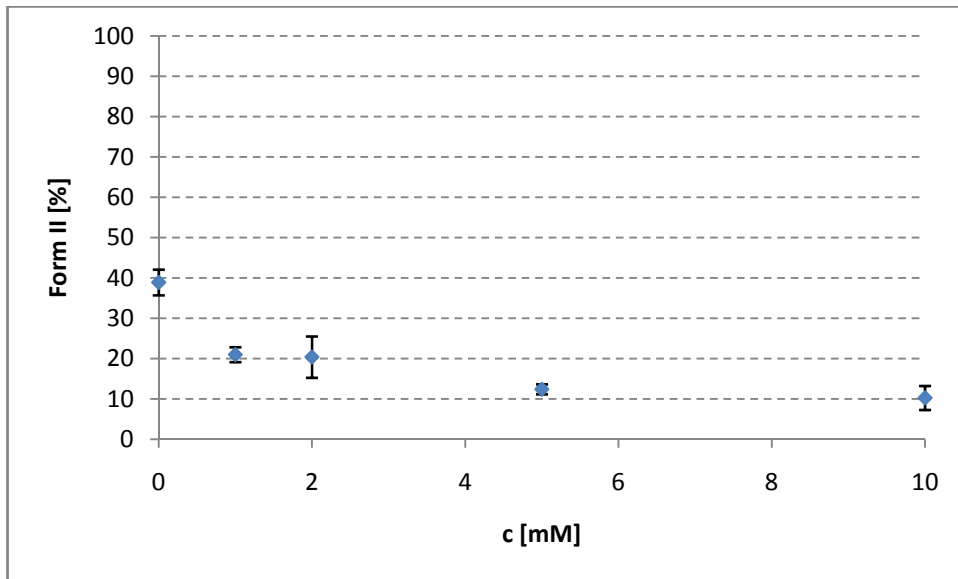
**Abbildung 7-86:** Grafische Darstellung des Mittelwertes und der Standardabweichung von 10  $\mu\text{M}$  **46** mit pUC19-Plasmid-DNA. Die Graphen weisen bis auf einen Ausreißer eine gute Konsistenz auf, und beschreiben eine Abnahme der Spaltmenge mit zunehmender Konzentration von EDTA.

Eine äquivalente Übersicht für die  $\text{MgCl}_2$ -abhängigen Daten findet sich in *Tabelle 7-30*:

**Tabelle 7-30:** Übersicht über die experimentell ermittelten Spaltmengen für die Inkubation mit  $\text{MgCl}_2$ , die errechneten Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

$\text{MgCl}_2$ [mM]	Exp. 1 [%]	Exp. 2 [%]	Exp. 3 [%]	$\bar{x}$ [%]	$\sigma$ [%]
0	43.3	35.9	37.5	38.9	3.2
1	22.6	18.4	22.0	21.0	1.9
2	27.0	14.5	19.7	20.4	5.1
5	11.9	11.2	14.1	12.4	1.2
10	9.6	7.0	14.2	10.3	3.0

Der Einfluss der Mg-Ionen ist deutlich stärker, als der von EDTA, denn bei 10 mM erreicht die Menge der open-circle-DNA mit 10.3 % nur noch etwa ein Viertel des Wertes, bei dem  $\text{MgCl}_2$  abwesend ist. Betrachtet man dazu die Darstellung in *Abbildung 7-87*, so verdeutlicht die Grafik nochmals eindrucksvoll den allgemeinen Trend der Bildung von open-circle-DNA bei steigender  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration.



**Abbildung 7-87:** Grafische Darstellung des Mittelwertes und der Standardabweichung von 10  $\mu\text{M}$  **46** mit pUC19-Plasmid-DNA. Die Graphen weisen bis auf einen Ausreißer eine gute Konsistenz auf, und beschreiben eine starke Abnahme der Spaltmenge schon bei kleinen  $\text{MgCl}_2$ -Konzentrationen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl EDTA als auch  $\text{MgCl}_2$  -mit unterschiedlicher Stärke- die Bildung von open-circle-DNA vermindern, wobei die Substanzen jeweils unterschiedlich mit DNA bzw. **46** interagieren, weil sie verschiedene Ladungen aufweisen. Es ist anzunehmen, dass  $\text{MgCl}_2$  schon bei relativ geringen Konzentrationen die negativen Ladungen des Phosphat-Rückgrats neutralisiert, und somit die elektrostatische Attraktion von **46** an DNA zumindest teilweise unterbindet.

Anders bei EDTA, denn dieses Molekül ist im Gegensatz zu den positiven  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen negativ geladen, und wird daher mit der ebenfalls negativ geladenen DNA kein Ionenpaar bilden. Es ist daher anzunehmen, dass dies eher mit **46** geschieht, und die Menge von Form II-DNA auf diese Weise reduziert wird.

Zusätzlich kann man sagen, dass die beobachtete Spaltung nicht durch eingeschleppte, hydrolytisch spaltende Metall-Kontaminationen verursacht sein kann, da EDTA diese Ionen, wenn vorhanden, komplexiert und so der Reaktion entzieht.

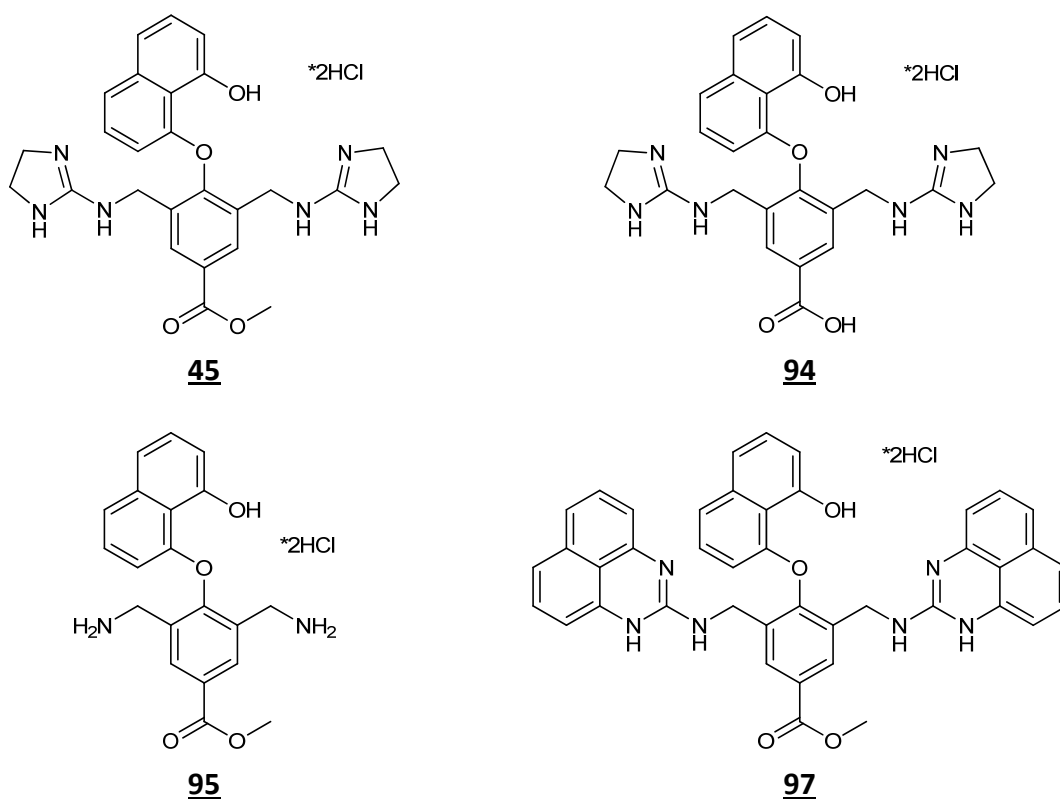


## 8. ZUSAMMENFASSUNG

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen vor allem die Synthesen der Verbindungen **45** und **46** und ihre anschließende Charakterisierung bezüglich der DNA-Spaltung.

Da der Bisguanidinium-Alkohol **45** durch die bekannten Vorschriften jedoch nicht zugänglich war, musste eine gänzlich neue Synthese ausgearbeitet werden, um **45** zuverlässig darstellen zu können. Hierzu wurden erst drei Routen erfolglos beschritten, bis mit der vierten Route letztlich ein Weg gefunden wurde, der zuverlässig **45** lieferte. Dies war zudem auch noch eine notwendige Voraussetzung, um **46** darstellen zu können.

Diese neue Synthese beinhaltet keine problematischen Reaktionen mehr, liefert höhere Ausbeuten und kommt ohne HPLC-Aufreinigung aus. Gleichzeitig eignete sich das hier ausgearbeitete Syntheseprotokoll dazu, um die Derivate **94**, **95** und **97** herzustellen und zu charakterisieren, wobei der Schwerpunkt bzgl. Synthese und Charakterisierung bei den unselektiven Verbindungen auf Molekül **45** lag:



**Abbildung 8-1:** Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten und untersuchten, sequenzunselektiven DNA-Spalter.

Der durch eine 11-stufige Synthese zugängliche Bisguanidinium-Alkohol **45** zeigt einen DNA-spaltenden Effekt ab einer Konzentration von etwa 50 bis 100  $\mu\text{M}$ . Mit zunehmender Konzentration (untersucht bis 10 mM) steigt auch die Menge der open-circle-DNA bis auf

etwa 30 % immer weiter an. Eine Untersuchung auf die pH-Abhängigkeit der Spaltung zeigt eine Zunahme der Aktivität von pH 7 bis 10.2 (bei gleichbleibender Konzentration von **45**). Es konnte nachgewiesen werden, dass der spaltende Effekt nicht O<sub>2</sub>-abhängig ist und nur unwesentlich von der Anwesenheit von Mg<sup>2+</sup> oder EDTA beeinflusst wird. Diese Erkenntnisse bestätigen in guter Näherung bzw. ergänzen die bereits bekannten Daten<sup>[47]</sup>. Es soll jedoch an dieser Stelle erwähnt sein, dass bei einer anderen Charge von **45** etwas höhere Werte erreicht werden konnten (womöglich durch Bildung der Carbonsäure **94**).

Darüberhinaus konnte experimentell geklärt werden, dass die Spaltung der DNA sowohl bei Purinen als auch bei Pyrimidinen auftritt und keine Präferenz für Apurin-Stellen besteht.

Die Bisguanidinium-Carbonsäure **94** konnte leicht durch Abwandlung der allgemeinen Synthese von **45** nach insgesamt 11 Stufen erhalten werden, wurde aber aus zeitlichen Gründen nur wenig in Experimenten mit DNA untersucht. Die Verbindung zeigte eine erstaunliche Spaltaktivität ab einer Konzentration von 80 µM (die geringste untersuchte Konzentration) und 100 %ige Spaltung bei 10 mM (die höchste getestete Konzentration). Diese Werte weisen -verglichen mit **45**- auf eine 125fach höhere Spalteffizienz hin. Dieser DNA-Spalter birgt vermutlich noch einiges Potential für eine nähere Betrachtung.

Das Bisamin **95** konnte nach einer 9-stufigen Synthese erhalten werden, und wurde eingehend in Experimenten mit DNA untersucht. Dieses Molekül zeigte Effekte gegenüber Plasmid-DNA ab 5 µM. Eine vollständige Relaxierung (= 100 % open circle) konnte bei 5 mM nach 20 stündiger Inkubation erreicht werden. Das Bisamin zeigte eine annähernd konstante Spaltaktivität von pH 7 bis 9, und verliert bei noch höheren Werten stark an Aktivität. Auch **95** weist damit eine deutlich verbesserte Spalteffizienz auf als **45**, die in diesem Fall 100fach höher liegt.

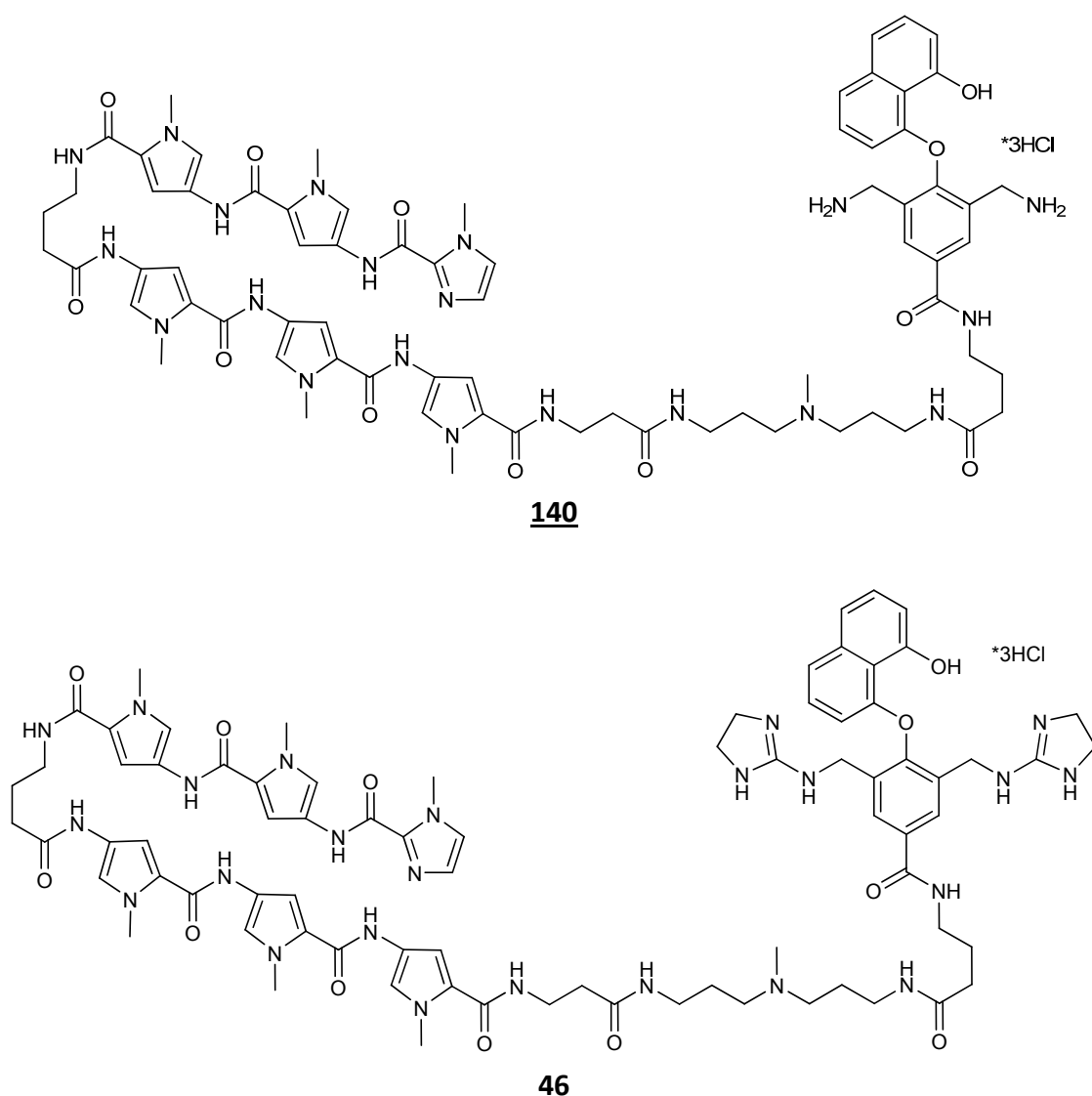
Das letzte der unselektiv wirkenden Moleküle, der Bisperimidinium-Alkohol **97**, war durch eine 10-stufige Synthese zugänglich, und unterscheidet sich schon durch seine schlechte Löslichkeit in wässrigen Pufferlösungen von den anderen Reagenzien. Es zeigte aber trotzdem DNA-spaltende Eigenschaften ab einer Konzentration von etwa 8 µM. Im Gegensatz zu den anderen Molekülen stieg die Menge der gespaltenen DNA nicht mit zunehmender Konzentration, sondern durchläuft ein Plateau mit einer maximalen Spaltung von 30 % bei 62.5 µM. Damit ist die Effizienz der Spaltung gegenüber **45** um den Faktor 320 erhöht.

Neben der Synthese von **45** musste auch noch ein Weg gefunden werden, wie man Polyamide in flüssiger Phase darstellen kann. Der erste ausgearbeitete Syntheseweg scheiterte wegen der Bildung von Azlactonen auf einer der letzten Stufen.

Die Darstellung gelang schließlich im zweiten Anlauf und macht nun Polyamide im Multigramm-Maßstab zugänglich. Desweiteren erweist sich die entwickelte Methode als

sehr flexibel, da man das (gewünschte) Polyamid aus einzelnen, größeren Bausteinen zusammensetzen kann. Die Synthese verläuft hier nicht sequenziell wie z.B. an fester Phase. Dies erlaubt es, die Abfolge der Heterozyklen relativ leicht zu ändern und das Polyamid so neuen Aufgaben oder Bestimmungen anzupassen.

Auch ein geeigneter Linker ist entwickelt worden, der der DNA-spaltenden Einheit **45** eine gewisse Flexibilität verleiht, ohne dabei die bindenden Eigenschaften des Polyamids zu beeinträchtigen. Letztlich konnten sowohl das Polyamid-Bisamin **140** und das Polyamid-Bisguanidin **46** zugänglich gemacht werden:



**Abbildung 8-2:** Struktur der potentiell sequenzselektiven DNA-Spalter **140** und **46**.

Die Darstellung des Bisamins **140** machte eine 36-stufige, konvergente Synthese notwendig. In den folgenden Spaltexperimenten mit Plasmid-DNA zeigte **140** schon bei einer Konzentration von 20 bis 40 nM einen Effekt, und erreichte ein Maximum bei 156 nM. Wie schon bei **97** und im Gegensatz zu den übrigen DNA-Spaltern nimmt die Menge der Form II-DNA nicht mit ansteigender Konzentration des Spalters zu, sondern durchläuft ein Plateau,

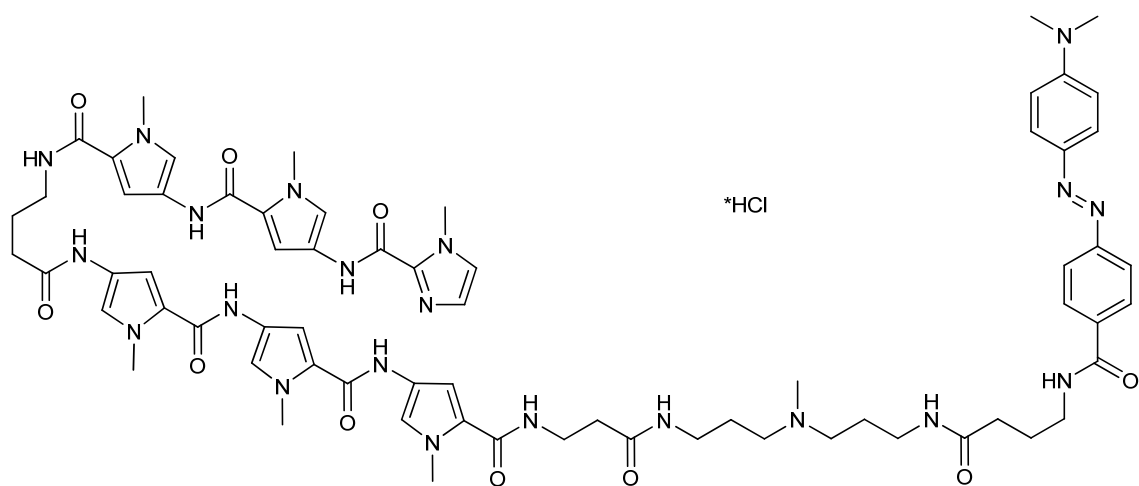
nach dem die Menge von Form II-DNA wieder absinkt. Trotzdem wies **140** damit eine etwa 4000fach höhere Spalteffizienz auf als **45**. Die Untersuchungen zum Einfluss des pH-Werts auf die Spaltung ließen keinen endgültigen Schluss zu, denn **140** zeigte sich bei diesen Untersuchungen als inaktiv, was im Widerspruch zu den Experimenten zur Konzentrationsabhängigkeit steht.

Die Synthese zur Darstellung des Polyamid-Bisguanidins **46** war mit 38 nichtlinearen Stufen die aufwändigste dieser vorliegenden Arbeit. Im Gegenzug zeigte es sich in den Experimenten mit DNA aber als erstaunlich aktiv, denn ein Spalteffekt war schon ab 78 nM und ein Maximum von 40 % Form II-DNA bei 5 µM zu beobachten. Die so bestimmten Werte deuten im Vergleich zu **45** auf eine 8000fach verbesserte Spalteffizienz hin.

Im Unterschied zu **140** ließ sich für **46** einen pH-Wert (7) bestimmen, bei dem die Spaltung maximal verläuft. Bei weitergehenden Untersuchungen wurde getestet, ob sich die Anwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$  oder EDTA auf die Spaltaktivität auswirkt. Hier zeigte sich eine starke Abnahme der Aktivität bei steigenden Konzentrationen sowohl von  $\text{Mg}^{2+}$  als auch von EDTA. Neben den üblichen pH- und Konzentrationsuntersuchungen ist hier auch eine Kurzzeit- und eine Langzeit-Kinetik durchgeführt worden. Während man einen stetigen Anstieg von open-circle-DNA und einen Übergang in eine Art Sättigung nach 24 h in der Kurzzeit-Untersuchung beobachten konnte, war das Langzeit-Experiment nicht so eindeutig zu interpretieren, denn die Hintergrund-Hydrolyse der Plasmid-DNA nahm so weit zu, dass eine eindeutige Aussage nicht mehr zu treffen war.

Eine weitere Derivatisierung von **46** mit Mannich-Basen zur weiteren Steigerung der Reaktivität war nicht erfolgreich, da Testreaktionen eine sehr schnelle Reaktion mit dem Polyamid-Teil von **46** anzeigten. Wegen der Labilität der Mannich-Basen gegenüber Säure war es auch nicht möglich, diese Gruppen in früheren Stufen einzuführen, da die Syntheseroute noch mehrere Reaktionen in relativ konzentrierten Säuren vorsah.

Zur Untersuchung der Orientierung von Polyamiden in der *minor groove* wurde aufbauend auf der neu entwickelten Polyamid-Synthese das Molekül **141** hergestellt, welches den Farbstoff DABCYL trägt. Zunächst konnten die bindenden Eigenschaften mit der LILBID-Spektrometrie untersucht und nachgewiesen werden. Die Orientierung von **141** wurde durch Quenching der Fluoreszenz vom Duplex **146** nachgewiesen.



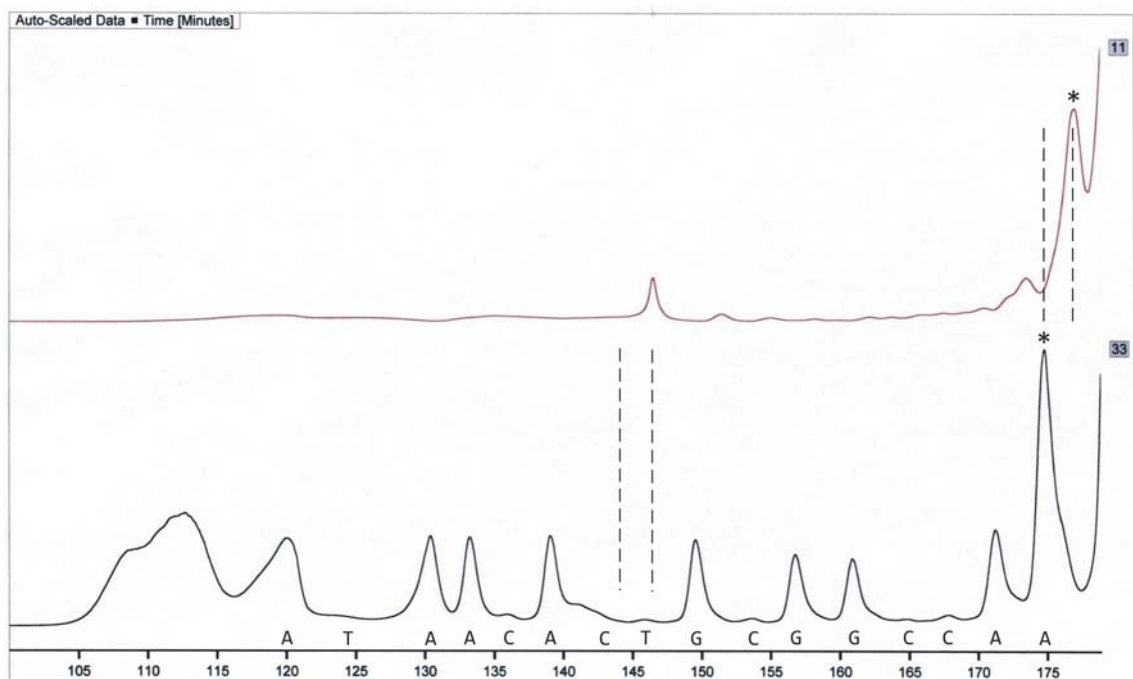
**Abbildung 8-3:** Struktur des DABCYL-markierten Polyamides **141** zur Untersuchung der Orientierung in der *minor groove*.



## 9. AUSBLICK

Mit dem Polyamid-Bisguanidin **46** bzw. dem Amin **140** wurden erste Experimente zum Nachweis einer sequenzselektiven Spaltung durchgeführt, die aber bisher noch keine eindeutigen Ergebnisse lieferten.

Die DNA **146** wurde dazu für 20 h mit **140** inkubiert und dann sequenziert (*Abbildung 9-1*): Die mit [33] gekennzeichnete Linie repräsentiert die Purin-Leiter und dient der Orientierung. In der mit [11] markierten Linie ist nur ein, bestenfalls zwei Peaks zu erkennen. Dies ließe darauf schließen, dass bei Inkubation mit **140** im Wesentlichen nur ein Spalt-Produkt entsteht.



**Abbildung 9-1:** Sequenzierung des Spalt-Experiments von **140** und Duplex-DNA. Die Peaks in der schwarzen Linie zeigen die Purine des Cy5-DNA-Stranges an. Die magenta-farbene Linie zeigt einen intensiven Peak, dem man ein Cytosin zuordnen kann, wenn man den Offset zwischen den beiden mit \* gekennzeichneten Peaks berücksichtigt. Im Bereich von 105 bis 115 min sind die kürzeren Sequenzen zu finden, die unterhalb der Auflösung des Gerätes liegen.

Unter Berücksichtigung des Laufunterschiedes zwischen den beiden Linien (angedeutet durch die unterbrochenen Linien) und Vergleich mit der Purin-Leiter konnte der Peak in Linie [11] vorläufig folgender Sequenz zugeordnet werden:



**Abbildung 9-2:** Sequenz der detektierten DNA aus dem Spaltexperiment von Duplex-DNA **146** mit **140**.

Die Spaltstelle läge zwischen T und C und ist *Abbildung 9-3* rot markiert<sup>[XVIII]</sup>:



**Abbildung 9-3:** Im obigen Experiment lokalisierte und in der Darstellung rot markierte Spaltstelle von **140** im DNA-Duplex. Die Bindesequenz des Polyamides ist fett dargestellt.

Diese erhaltenen Daten sind konsistent mit der experimentell bestimmten Orientierung des Polyamides in der *minor groove*. Eine Spaltung an der benannten Stelle wäre bei anderer Orientierung nicht möglich.

Leider konnte dieser Befund nicht in dieser Deutlichkeit reproduziert werden, und daher war noch nicht abschließend zu klären, ob ein tatsächlicher Effekt nachgewiesen oder nur ein Artefakt beobachtet wurde.

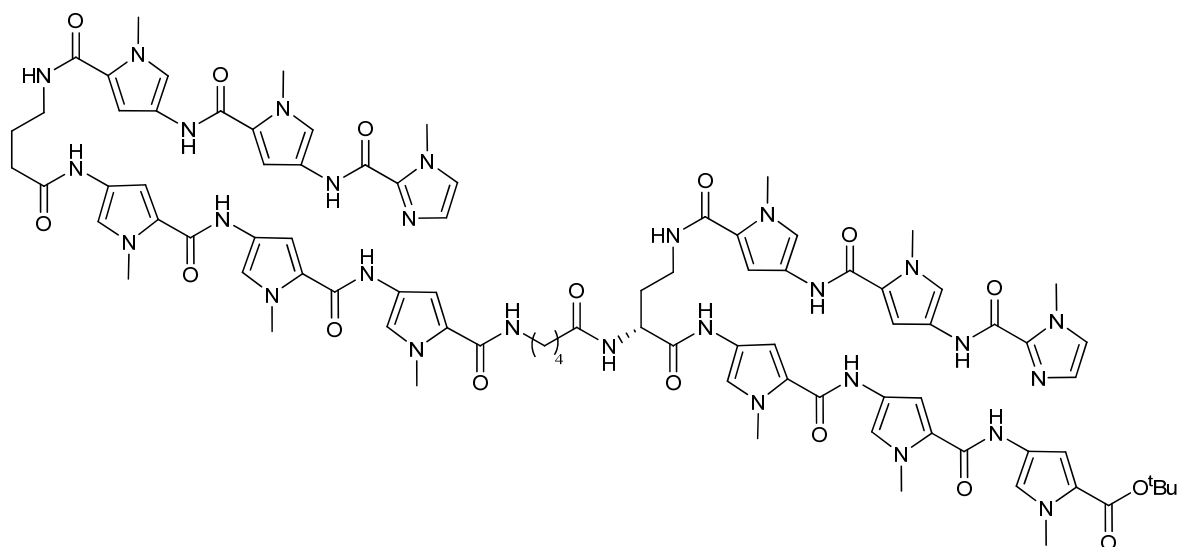
Die Untersuchung auf sequenzselektive Spaltung sollte daher in zukünftigen Experimenten im Mittelpunkt stehen.

Dies könnte beispielsweise dadurch untersucht werden, dass man einen DNA-Strang mit einer fluoreszierenden Substanz markiert und anschließend per HPLC/MS mit Fluoreszenz-Detektor untersucht. So hätte man über die Massen auch gleich Hinweise auf die Sequenz bzw. auf die Anwesenheit von kovalent gebundenem Spalter.

Sollte tatsächlich zukünftig eine Sequenzselektivität nachgewiesen werden, kann man -zur weiteren Verbesserung- das Polyamid dahingehend verändern, dass es längere DNA-Sequenzen erkennt und bindet. Dies kann einerseits durch Erweiterung des heterozyklischen Ringsystems auf 4 Ringe pro Seite des Hairpins geschehen, und/oder durch Dimerisierung zu einem Tandem-Polyamid (siehe *Abbildung 9-4*):

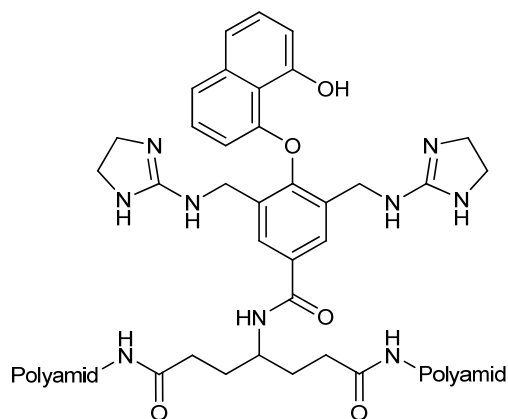
<sup>XVIII</sup> Diese Zuordnung der Spaltstelle ist nicht vollständig sicher, da es bei einer nucleophilen Substitution mechanistisch möglich wäre, dass das Polyamid **140** noch kovalent an der DNA hängt. In diesem Fall wäre eine Spaltstelle (wegen Veränderung der Retentionszeit durch **140**) nicht ohne weiteres aus der Analytik abzulesen. Falls das Polyamid nicht an der DNA hängt muss noch geklärt werden, ob der DNA-Strang mit einem Phosphat endet oder mit einer Zucker-Hydroxy-Gruppe.



**148**

**Abbildung 9-4:** Struktur des angedachten Tandem-Polyamides **148** zur Erweiterung der Erkennungssequenz auf 11 Nukleotide (5'-TGTTATTGTTA-3')<sup>[XIX]</sup>.

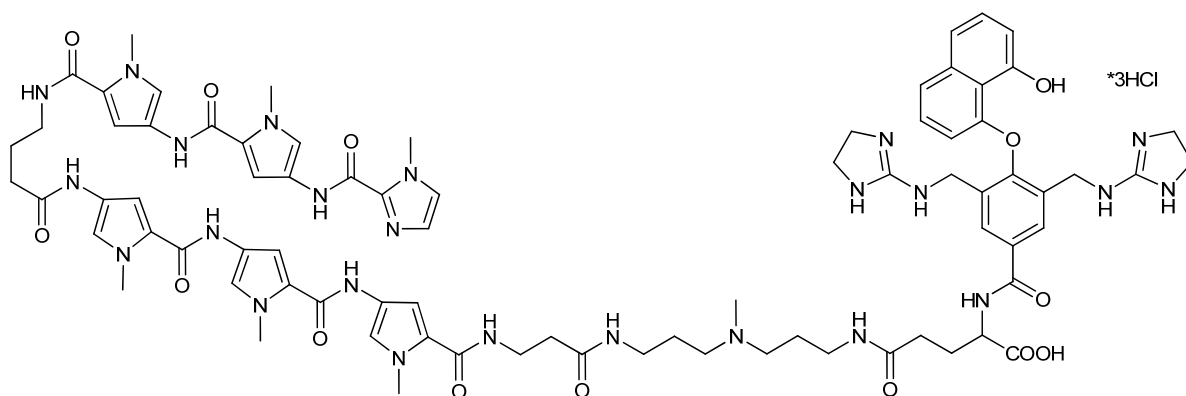
Eine synthetisch möglicherweise weniger aufwändige Möglichkeit wäre die Verwendung der 4-Aminoheptandisäure als verzweigendes Element. Man könnte so zwei Polyamide an eine DNA-spaltende Einheit anhängen, sodass die Spaltstelle in der Mitte der Bindesequenz liegen würde. Gleichzeitig würde dadurch die erkannte DNA-Sequenz deutlich verlängert:

**149**

**Abbildung 9-5:** Struktur eines des durch eine Carbonsäure-Funktion erweiterten DNA.

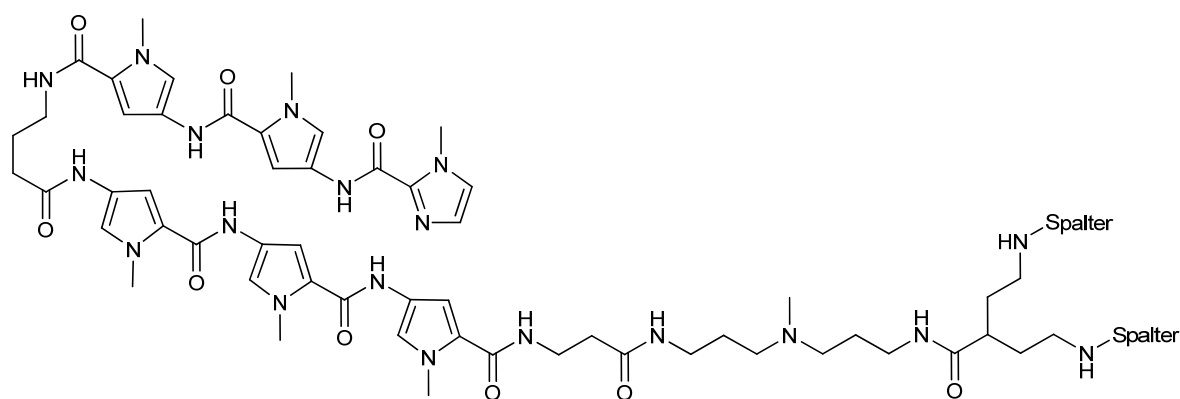
In Anlehnung zu den Daten, die für **94** vorliegen, könnte man **46** durch eine Carbonsäure erweitern, indem man orthogonal geschützte Glutaminsäure statt GABA verwendet. So hätte der resultierende DNA-Spalter **150** noch die Möglichkeit zur generellen Säurekatalyse, um die Abgangsgruppe bei der Phosphoryl-Transferreaktion zu protonieren:

<sup>XIX</sup> Kommerzielle Quelle für orthogonal geschützte Diaminobuttersäure: [www.iris-biotech.de](http://www.iris-biotech.de)

**150**

**Abbildung 9-6:** Struktur des durch eine Carbonsäure-Funktion erweiterten DNA-Splatters **150**.

Man könnte aber auch den Linker des Polyamids so verändern, dass dort zwei Bisguanidinium-Carbonsäuren **94** anknüpfbar wären:

**151**

**Abbildung 9-7:** Erweiterung des DNA-spaltenden Moleküls auf zwei Bisguanidinium-Einheiten.

Neben all diesen Modifikationen wäre auch noch ein Screening für die optimale Linker-Länge denkbar, denn es ist noch nicht nachgewiesen, dass **46** schon die optimale Länge aufweist.

## 10. EXPERIMENTELLER TEIL

### 10.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

#### Chromatographie - Dünnschichtchromatographie:

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator verwendet (*Merck* Nr. 5554; 0.2 mm Schichtdicke). Die Laufstrecke betrug 3.5-5.0 cm. Alle  $R_f$ -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. UV-aktive Substanzen wurden mit einer UV-Lampe der Firma *Konrad Benda* (Typ NU-6KL) bei Wellenlängen von 254 nm bzw. 366 nm sichtbar gemacht.

Als Färbereagenz für Amine wurde eine Ninhydrinlösung verwendet (5.00 g Ninhydrin gelöst in 50 ml Aceton und 50 ml n-Butanol).

Aromatische Alkohole wurden mit einer Cer(IV)-sulfat-Lösung angefärbt (2 g Phosphormolybdänsäure und 1 g Cer(IV)-sulfat gelöst in 100 ml einer 9:1-Mischung von Wasser und konz. Schwefelsäure).

#### Chromatographie - Präparative Säulenchromatographie:

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (0.04-0.063 mm) der Firma *Merck* oder alternativ von der Firma *Macherey Nagel* verwendet.

#### Chromatographie - Analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie:

Für analytische HPLC-Messungen:

*Jasco* LG-980-02 Ternary Gradient Unit, *Jasco* DG-980-50 Degaser, *Jasco* PU-980- HPLC-Pump, *Jasco* UV-975 UV/VIS-Detektor, *Polymer Laboratories* PL-ELS 1000, *Dr. A. Maisch* ReprosiPur C18-AQ RP Säule, *Kipp&Zonen* Zweikanalschreiber BD112, *Merck-Hitachi* D-2500 Chromato-Integrator.

Für Kinetik-Messungen:

*Jasco* LG-980-02 Ternary Gradient Unit, *Jasco* DG-980-50 Degaser, *Jasco* PU-980 HPLC-Pump, *Jasco* UV-975 UV/VIS-Detektor, *Jasco* MD-2010 Diode Array Detector und *Jasco* LC-Net II DAC mit einer *Merck* LiChrospher 100 RP-18e (5  $\mu$ m) Säule. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte zunächst der Software BorWin Version 1.22 von *JMBS Developments*, später mit der *Jasco* Chrompass-Software.

#### Chromatographie - Semipräparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie:

Es wurden folgende Geräte verwendet: Programmierbare *Waters* Pumpe 590, Differentialrefraktometer R 401, Einkanalpotentiometerschreiber *BBC Metrawatt*

Servogor 120, Fraktionssammler *Isco Foxy*, *Waters* UV-Detektor Modell 440, Refraktometer-Detektor *Waters* 410, Servogor Zweikanalschreiber und *Knauer* Eurochrom 2000 Integration Package.

#### **DNA-Sequenzierung:**

ALFexpress von GE Healthcare mit Steuersoftware ALFwin 2.1 und Auswertungsoftware AlleleLinks 2.1 unter Win95.

#### **Druckapparatur:**

Roth Laborautoklav Modell 1, Reaktionsvolumen 100 ml, max. Betriebsdruck 100 bar, max. Betriebstemperatur 300 °C.

#### **Elementaranalyse:**

Die Elementaranalysen wurden mit dem Gerät *Heraeus* CHN Rapid erstellt.

#### **Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR):**

Für die Aufnahme der FT-IR-Spektren wurde das Gerät 420 Series der Firma *Jasco* oder das Gerät 1600 Series der Firma *Perkin Elmer* verwendet. Die Messungen wurden an KBr-Preßlingen bzw. NaCl-Fenstern der jeweiligen Substanz durchgeführt. Die Signale wurden auf ganze Zahlen gerundet und sind in Wellenzahlen ( $\text{cm}^{-1}$ ) angegeben. Die Bandenintensitäten werden mit s für strong, m für medium und w für weak gekennzeichnet.

#### **Lösungsmittel:**

Die Lösungsmittel Hexan, EtOAc, Dichlormethan, Methanol und Ethanol wurden in technischer Qualität beschafft und vor Verwendung destilliert.

<sup>i</sup>PrOH, Chloroform und Diethylether wurden als p.a.-Ware gekauft und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

#### **Massenspektrometrie:**

Für ESI-MS wurde das Elektrospray-Gerät der Firma *Fisons* (VG Plattform II) verwendet; für MALDI-MS diente das Gerät VG TOFSpec der Firma *Fisons*. Als Matrix diente 2,5-Dihydroxybenzoesäure. Wenn im Massenspektrum Fragmentierung zu sehen war, sind in Klammern Werte angegeben, die für die Basispeak-Intensität (BPI) stehen und in % angegeben sind.

#### **NMR-Spektroskopie:**

Zur Aufnahme der NMR-Spektren wurden die Geräte AM 250 (250 MHz), DPX 250 (250 MHz), AV 300 (300 MHz) bzw. AMX 400 (400 MHz) der Firma *Bruker* verwendet. Die

Spektren werden über die Steuersoftware TopSpin der Firma *Bruker* aufgenommen; die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm Mestrec<sup>[xx]</sup>.

Die chemische Verschiebung  $\delta$  wird in ppm angegeben und auf das jeweilige Lösungsmittel bezogen. Für  $^1\text{H}$ -Spektren gilt:  $\delta = 2.50$  ppm ( $\text{DMSO-d}_6$ ) und  $\delta = 7.26$  ppm ( $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ). Für  $^{13}\text{C}$ :  $\delta = 39.43$  ppm ( $\text{DMSO-d}_6$ ) und  $\delta = 77.0$  ppm ( $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ). Die Kopplungskonstanten  $J$  werden in Hz aufgelistet und die Feinstruktur der  $^1\text{H}$ -Signale wird mit s für Singulett, br für breites Singulett, d für Dublett, dd, für Dublett von Dubletts, t für Triplett, q für Quartett, qn für Quintett, sx für Sextett und m für Multiplett bezeichnet. Die für die Zuordnung relevanten Protonen sind kursiv abgebildet. Mit  $\text{D}_2\text{O}$  austauschende Protonen sind mit einem Stern (\*) markiert. Alle Messungen erfolgten bei 300 K, sofern nicht anders angegeben.

Die Strukturaufklärung der verschiedenen Produkte wurde durch eine geeignete Kombination von  $^1\text{H}$ -, H,H-COSY-,  $^{13}\text{C}$ -, DEPT135-, HSQC- und HMBC-Experimenten durchgeführt.

#### **Reagenzien:**

Alle verwendeten Reagenzien sind kommerziell erhältlich und wurden – wenn nicht anders angegeben - ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Zulieferer waren die Firmen *Sigma-Aldrich*, *Acros*, *Alfa Aesar* und *NovaBiochem*.

#### **Schmelzpunkte:**

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mit einem Heiztischmikroskop nach *Kofler*. Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert angegeben.

#### **Speed-Vac:**

Zur Trocknung von geringen Mengen wurde eine *Savant* SpeedVac Plus SC110A mit einer *Savant* Universal Vacuum System Plus UVS400A-Pumpe verwendet.

#### **Thermostat:**

Lauda RM6, Temperaturgenauigkeit  $\pm 0.1$  °C

#### **Wasserfreie Lösungsmittel:**

THF wurde direkt vor Gebrauch von Natrium/Benzophenon abdestilliert.

Alle anderen benötigten wasserfreien Lösungsmittel wurden als absolutierte Ware über Molsieb in Crowncap-Flaschen von der Firma *Fluka* gekauft und permanent unter Argon gelagert.

---

<sup>xx</sup> <http://www.mestrec.com/>

## 10.2 Allgemeine synthetische Vorschriften

### Anionentauscher: Dowex® 1x8 (200-400 mesh) Cl<sup>-</sup>-Form

Der Anionentauscher wird vor der Verwendung gründlich mit (etwa 20 Kolonnenvolumen) MeOH gewaschen.

### Entgasen von Lösungsmitteln:

Das jeweilige Lösungsmittel wird zunächst mit flüssigem Stickstoff eingefroren und danach unter Vakuum auf RT aufgewärmt. Diese Prozedur wird noch ein weiteres Mal wiederholt.

### Palladium-katalysierte Reduktionen unter H<sub>2</sub>-Druck:

Eine Autoklavenhülle wird zunächst für 5 min mit Ar gespült, und dann mit der berechneten Menge des Katalysators befüllt. Unter einem permanenten Ar-Strom wird dann 10 ml des entsprechenden Lösungsmittels langsam zugegeben (der Katalysator soll komplett mit Lösungsmittel überschichtet sein). Zu dieser Suspension gibt man dann das zu reduzierende Edukt zusammen mit weiterem Lösungsmittel wie angegeben, und evtl. andere Reagenzien. Die Autoklavenhülle wird im Bombenrohr eingeschlossen, das Manometer etwa zur Hälfte aufgeschraubt und die Apparatur für 3 min mit Ar geflutet. Der Autoklav wird dann dicht verschlossen und 3x mit H<sub>2</sub> gespült: hierzu gibt man etwa 5 bar Druck auf die Apparatur und lässt das Gas langsam wieder entweichen. Danach wird der für die Reaktion angegebene Druck auf die Apparatur gegeben.

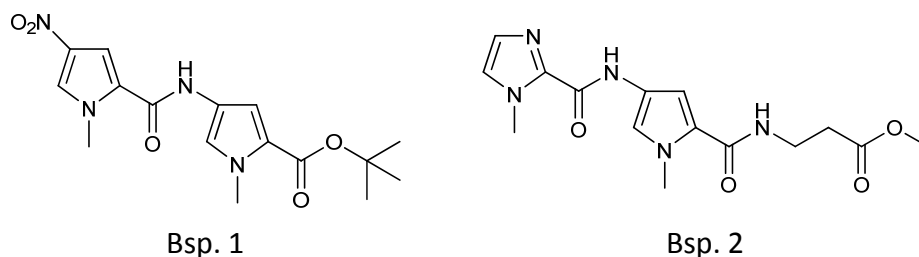
Nach beendeter Reaktion lässt man die gesamte Apparatur auf RT abkühlen (falls geheizt wurde) und lässt den Druck langsam ab. Danach wird die Apparatur etwa zur Hälfte aufgeschraubt und 3 min mit Ar gespült, bevor man den Autoklav vollständig öffnen und die Hülle entnehmen kann.

Diese allgemeine Arbeitsvorschrift gilt auch für andere Edelmetall-katalysierte Reaktionen, die ein hohes Brandrisiko bergen.

## 10.3 Zur Nomenklatur der synthetisierten Verbindungen

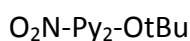
Ein Großteil der hier synthetisierten Verbindungen besteht aus heterozyklischen Di-, Tri- bzw. Oligomeren, für die von Dervan eine Kurzschreibweise entwickelt und publiziert wurde. So wird ein Polyamid vom N- zum C-Terminus mit einer Reihe von ein- bzw. zwei-buchstabigen Abkürzungen angegeben. Dazu kommt noch ein jeweiliger Substituent am N-

oder C-Terminus. Das Schema der Nomenklatur soll hier kurz vorgestellt werden, da es für die Erstellung der Namen auf den folgenden Seiten Anwendung findet:



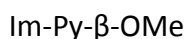
**Abbildung 10-1:** Beispielmoleküle zur Erläuterung der verwendeten Nomenklatur.

Beispiel 1 zeigt ein Amid-verbrücktes Pyrrol-Dimer, welches sowohl am N- als auch am C-Terminus einen Substituenten trägt. Der N-terminale Substituent ist eine Nitro-Gruppe, der C-terminale ein <sup>t</sup>Butylester. Die Kurzschreibweise lautet in diesem Fall:



Zuerst wurde der Substituent  $\text{NO}_2$  angegeben, gefolgt von zwei Pyrrol-Ringen und dem C-terminalen Substituenten  $\text{O}^t\text{Bu}$ .

Das zweite Beispiel enthält zwei unterschiedliche Heterozyklen und eine  $\beta$ -Alanin-Einheit, die C-terminal eine Methylester-Gruppe trägt. Es gibt in diesem Fall keinen N-terminalen Substituenten. Die Benennung lautet daher:



Wenn Konjugate aus einem Polyamid und einer anderen Einheit benannt werden, wird hinter der Kurzschreibweise einfach die Nummer der zugehörigen Einheit angegeben. Hierbei soll gelten, dass die Verknüpfung der beiden Molekülteile über eine Amidbindung erfolgt ist.

Durch diese Kurzschreibweise ist es möglich, relativ große Moleküle durch eine alpha-numerische Zeichenkette darzustellen, unter der man sich schnell das zugehörige Molekül vorstellen kann. Gleichzeitig werden so die langen und unübersichtlichen Namen vermieden, die nach den IUPAC-Regeln erstellt werden würden.

## 10.4 Liste der synthetisierten Verbindungen

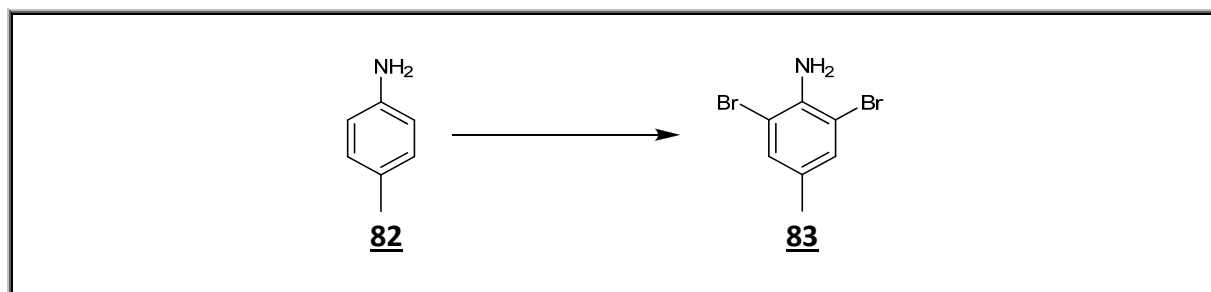
- 2,6-Dibromo-4-methylanilin (83)
- 2,6-Dicyano-4-methylanilin (84)
- 3,5-Dicyano-4-iodtoluol (81)
- 3,5-Dicyano-4-iodbenzoesäure (59)
- 3,5-Dicyano-4-iodbenzoesäuremethylester (50)
- Naphtho-1,8-diol (90)
- 4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-dicyanobenzo­esäuremethylester (86)
- 4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-(tert­butoxycarbonylamino-methyl)-benzo­esäuremethylester (87)
- 4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-[(4'',5''-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-benzo­esäuremethylester (45)
- 4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-[(2''-perimidinylamino)-methyl]-benzo­esäuremethylester (97)
- 4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-(tert­butoxycarbonylamino-methyl)-benzo­esäure (88)
- 4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-sulfonsäure (93)
- 2-Trichloracetyl-1-methylpyrrol (99)
- 4-Nitro-2-trichloracetyl-1-methylpyrrol (100)
- 4-Nitro-1-methylpyrrol-2-carbonsäure-tert-butylester (125)
- 2-Trichloracetyl-1-methylimidazol (103)
- $\gamma$ -Aminobutansäuremethylester Hydrochlorid (110)
- O2N-Py- $\gamma$ -OMe (111)
- O2N-Py-Py- $\gamma$ -OMe (112)
- Im-Py-Py- $\gamma$ -OMe (113)
- Im-Py-Py- $\gamma$ -OH (114)
- O2N-Py-Py-OtBu (126)
- O2N-Py-Py-Py-OtBu (127)
- O2N-Py-Py-Py-OH (128)
- 3-(tert.-Butyloxycarbonylamino­propyl)-3'-aminopropyl-N-methylamine (133)



- 3-(Benzyloxycarbonylamino)-propionsäure-(3-(N-methyl-N-(3-tert.-butyl oxy-carbonylaminopropyl)-aminopropyl)-amid (**134**)
- 4-(tert.-Butyloxycarbonylamino)-N-(3'-{[3''-(3'''-benzyloxycarbonylamino-propionylamino)-propyl]-methyl-amino}-propyl)butansäureamid (**135**)
- O2N-Py-Py-Py-β-C3-N(Me)-C3-γ-Boc (**137**)
- Im-Py-Py-γ-Py-Py-Py-β-C3-N(Me)-C3-γ-Boc (**138**)
- Im-Py-Py-γ-Py-Py-Py-β-C3-N(Me)-C3-γ-DABCYL (**141**)
- Im-Py-Py-γ-Py-Py-Py-β-C3-N(Me)-C3-γ-87 (**139**)
- Im-Py-Py-γ-Py-Py-Py-β-C3-N(Me)-C3-γ-95 (**140**)
- Im-Py-Py-γ-Py-Py-Py-β-C3-N(Me)-C3-γ-45 (**46**)

## 10.5 Reaktionsvorschriften

### 10.5.1 2,6-Dibromo-4-methylanilin (**83**)



16.10 g (150 mmol) **82** werden in 600 ml MeOH gelöst und mit 50.90 ml (450 mmol, 3 eq) einer 48%igen HBr-Lösung versetzt. Nach Abkühlen dieser Reaktionsmischung auf 0-5 °C tropft man langsam 30.60 ml (300 mmol, 2 eq) einer 30%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung so zu, dass die Temperatur 5 °C nicht übersteigt. Im Anschluss rührt man noch 12 h bei RT. Man fügt 300 ml H<sub>2</sub>O hinzu, filtriert den Feststoff ab und wäscht mit wenig H<sub>2</sub>O nach. Das Produkt wird im Vakuum getrocknet und aus EtOH umkristallisiert. Man erhält **83** als farblose Nadeln.

#### ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

**Ausbeute:** 37.98 g (95%)                      Theorie: 39.74 g

**DC:** Hex/EtOAc = 4:1                      R<sub>f</sub> = 0.74

**Schmelzpunkt:** 75 °C                      Lit.<sup>[133]</sup>: 75-77 °C

**<sup>1</sup>H-NMR:** (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
7.24 (s, 2H, 2xAr-H), 4.98 (br, 2H, NH<sub>2</sub>\*), 2.14 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR:** (δ[ppm], 60 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
140.20, 131.99, 127.83, 107.55, 18.99

**IR (KBr):** 3420 (w), 3301 (m), 2911 (w), 1774 (w), 1738 (w), 1618 (s), 1579 (m),  
1543 (m), 1478 (s), 1456 (m), 1284 (m), 1225 (w), 1212 (m), 1058 (m),  
989 (w), 897 (w), 855 (s), 782 (w), 735 (s), 706 (m), 639 (m), 558 (m)

**Masse:** ESI+ (berechnet für  $C_7H_7Br_2N+H^+$ ):

berechnet: 263.9

gefunden: 263.5

**Elementaranalyse:**  $C_7H_7Br_2N$

berechnet: C: 31.73

H: 2.66

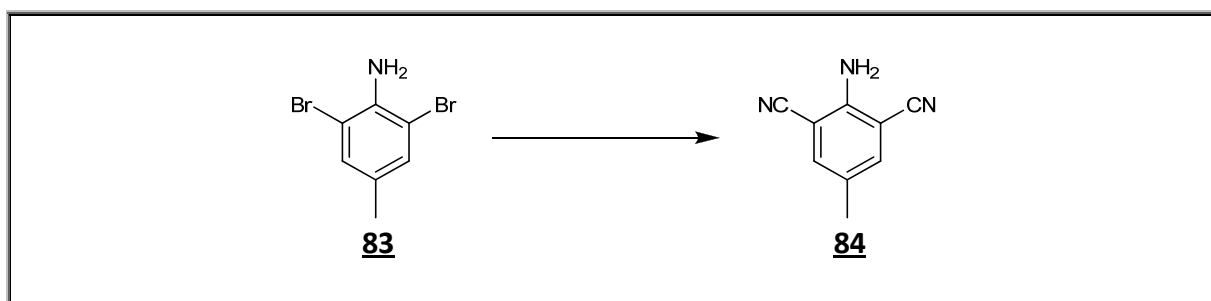
N: 5.29

gefunden: C: 31.76

H: 2.74

N: 5.12

### 10.5.2 2,6-Dicyano-4-methylanilin (**84**)



10.59 g (40 mmol) **83** werden unter Ar-Atmosphäre in einer Mischung aus 120 ml abs. DMF und 15 ml abs. Pyridin gelöst und mit 14.33 g (160 mmol, 4 eq) CuCN versetzt. Diese Suspension wird dann für 8 h zum Sieden erhitzt. Die noch heiße Reaktionslösung wird vorsichtig auf eine eisgekühlte KCN-Lösung (7.50 g auf 300 ml  $H_2O$ ) gegossen, und dann 150 ml Dichlormethan hinzugefügt. Diese Mischung wird für 30 min gerührt, anschließend filtriert, die org. Phase abgetrennt und die wässrige Phase noch 2x mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden mit 150 ml  $H_2O$  gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet, das Lösungsmittel evaporiert und der Rückstand an Kieselgel adsorbiert. Nach Aufreinigung via Säulenchromatographie an 300 g Kieselgel (Laufmittel: Hex/EtOAc = 3:1) und Trocknung im Vakuum erhält man **84** als blass gelben, analysenreinen Feststoff.

#### ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

**Ausbeute:** 4.61 g (73%)

Theorie: 6.29 g

**DC:** Hex/EtOAc = 3:1

$R_f$  = 0.48

**Schmelzpunkt:** 179 °C

Lit.<sup>[102]</sup>: 179 °C

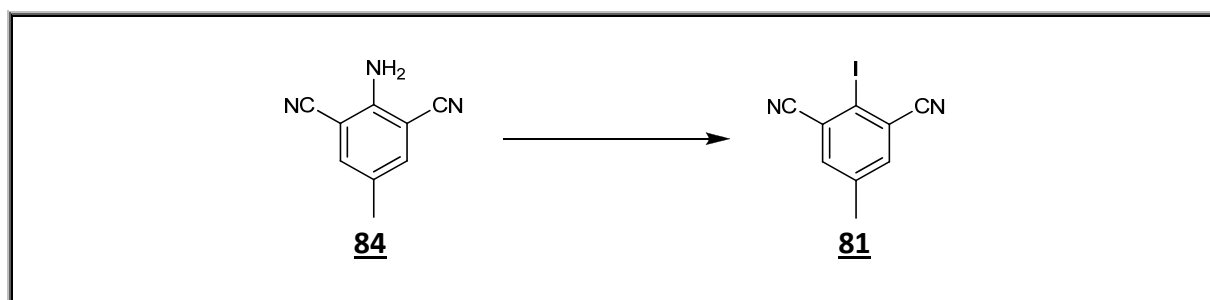
<b><math>^1\text{H-NMR}</math>:</b>	( $\delta$ [ppm], 250 MHz, DMSO- $d_6$ ): 7.62 (s, 2H, 2xAr-H), 6.53 (s, 2H, $\text{NH}_2^*$ ), 2.15 (s, 3H, Ar- $\text{CH}_3$ )
<b><math>^{13}\text{C-NMR}</math>:</b>	( $\delta$ [ppm], 60 MHz, DMSO- $d_6$ ): 150.07, 138.49, 125.61, 116.32, 96.12, 18.73
<b>IR (KBr):</b>	3404 (m), 3346 (m), 3243 (m), 2227 (m), 1654 (s), 1570 (w), 1490 (s), 1299 (m), 1252 (m), 1126 (w), 869 (w), 745 (w)

**Elementaranalyse:**  $\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_3$ 

berechnet:	C: 68.78	H: 4.49	N: 26.74
gefunden:	C: 68.65	H: 4.68	N: 26.70

**Kristallstrukturanalyse:**

Die Elementarzelle eines Einkristalls von **84** ist vermessen und mit der Literatur verglichen worden. Die Dimensionen der Elementarzelle des Einkristalls stimmen mit den publizierten Daten überein<sup>[134]</sup>.

**10.5.3 3,5-Dicyano-4-iodtoluol (**81**)**

2.00 g (12.72 mmol) **84** werden in 40 ml halbkonz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  suspendiert, und bei  $-5\text{ }^\circ\text{C}$  zunächst für 60 min gerührt. Zu dieser Suspension tropft man langsam eine Lösung aus 1.31 g (19.09 mmol, 1.5 eq)  $\text{NaNO}_2$  und 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und rührt im Anschluss noch 30 min bei  $0\text{ }^\circ\text{C}$ . Nach dieser Zeit tropft man die blass gelbe Lösung langsam zu einer eisgekühlten und gerührten Mischung von 21.12 g KI (127.25 mmol, 10 eq) und 300 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Nach beendeter Zugabe wird das Eisbad entfernt und die gelbbraune Suspension für 120 min bei RT gerührt. 100 ml DCM und 50 ml einer ges.  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung werden hinzugegeben, geschüttelt, die org. Phase abgetrennt und die wässrige noch 2x mit je 50 ml DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel evaporiert und der gelbe

Rückstand an Kieselgel adsorbiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an 200 g Kieselgel (Laufmittel: DCM/Hex/EtOAc = 30:30:1) erhält man **81** als weißen Feststoff.

#### ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

<b>Ausbeute:</b>	2.75 g (81%)	Theorie: 3.41 g
<b>DC:</b>	DCM/Hex/EtOAc = 30:30:1	R <sub>f</sub> = 0.36
<b>Schmelzpunkt:</b>	200-201 °C	Lit.: unbekannt
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 7.98 (s, 2H, 2xAr-H), 2.32 (s, 3H, Ar-CH <sub>3</sub> )	
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(δ[ppm], 60 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 140.15, 138.67, 121.11, 118.68, 102.21, 19.68	
<b>IR (KBr):</b>	3056 (m), 2236 (s), 1815 (m), 1560 (m), 1448 (m), 1418 (s), 1409 (s), 1380 (m), 1286 (s), 1231 (m), 1030 (s), 886 (s), 706 (s), 678 (w), 626 (w), 565 (w)	
<b>Elementaranalyse:</b>	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> I	
	berechnet:	C: 40.33      H: 1.88      N: 10.45
	gefunden:	C: 40.53      H: 2.08      N: 10.45

#### **Kristallstrukturanalyse:**

- Bestimmung der Kristallstruktur **81**:

Zur Bestimmung der Kristallstruktur von **81** wurde ein farbloser, stabförmiger Einkristall mit den Abmessungen 0.06 mm x 0.11 mm x 0.24 mm mit einem *Siemens* SMART CCD Diffractometer vermessen: Absorptionskoeffizient = 3.619 mm<sup>-1</sup>; Wellenlänge = 0.71073 Å; T = 166(2) K; Reflexe gemessen: 7195, davon unabhängig: 2798; R<sub>int</sub> = 0.0654; R-Werte (kompletter Datensatz: R<sub>1</sub> = 0.0396, wR<sub>2</sub> = 0.0604); Endgültige R-Werte [I > 2σ(I)]: R<sub>1</sub> = 0.0310, wR<sub>2</sub> = 0.0583.

Güte des „fits“ gegen F<sup>2</sup> = 1.055; Theta-Bereich der Datensammlung: 1.50° bis 32.45°; Restelektronendichte: 1.100 und -1.027 e/Å<sup>3</sup>.

Das erhaltene Beugungsmuster blieb auch bei wiederholter Messung konstant.

Eine numerische Absorptionskorrektur basierend auf 6 indizierten Kristallflächen ergab einen Transmissionsfaktor zwischen 0.411 und 0.823; äquivalente Reflexionen wurden gemittelt. Die Strukturbestimmung erfolgte mit direkten Methoden unter Verwendung des Programms SHELXS. Die H-Atome wurden geometrisch positioniert.

Die Struktur wurde dann mit dem Programm SHELXL-97 gegen  $F^2$  verfeinert.

- Kristalldaten:

Triklin, Raumgruppe P -1

Längen:  $a = 4.0928(10) \text{ \AA}$   $b = 7.8695(15) \text{ \AA}$   $c = 14.057(4) \text{ \AA}$

Winkel:  $\alpha = 74.920(19)^\circ$   $\beta = 84.95(2)^\circ$   $\gamma = 86.738(15)^\circ$

$V = 435.19(18) \text{ \AA}^3$ ,  $\rho_{\text{ber}} = 2.046 \text{ Mg/m}^3$

- Diskussion der Struktur:

Der sechsgliedrige Ring ist planar (die mittlere Abweichung von der planaren Ebene beträgt  $0.003 \text{ \AA}$ ). Die Moleküle bilden Stapel entlang der a-Achse mit einem Abstand von  $3.57 \text{ \AA}$ . Die Stapel bilden zentrosymmetrische Paare, die relative kurze intermolekulare I---N-Abstände von  $3.105(3) \text{ \AA}$  aufweisen. Diese Abstände sind etwa  $0.4 \text{ \AA}$  kürzer als die Summe der van-der-Waals-Radien von I und N. Im Kristall treten darüber hinaus noch 2 intermolekulare C-H---N-Wechselwirkungen mit Abständen von  $2.59$  bzw.  $2.64 \text{ \AA}$  und C-H-N-Winkeln von  $154$  bzw.  $144^\circ$  auf.

**Tabelle 10-1:** Bindungslängen [ $\text{\AA}$ ] der Verbindung **81**

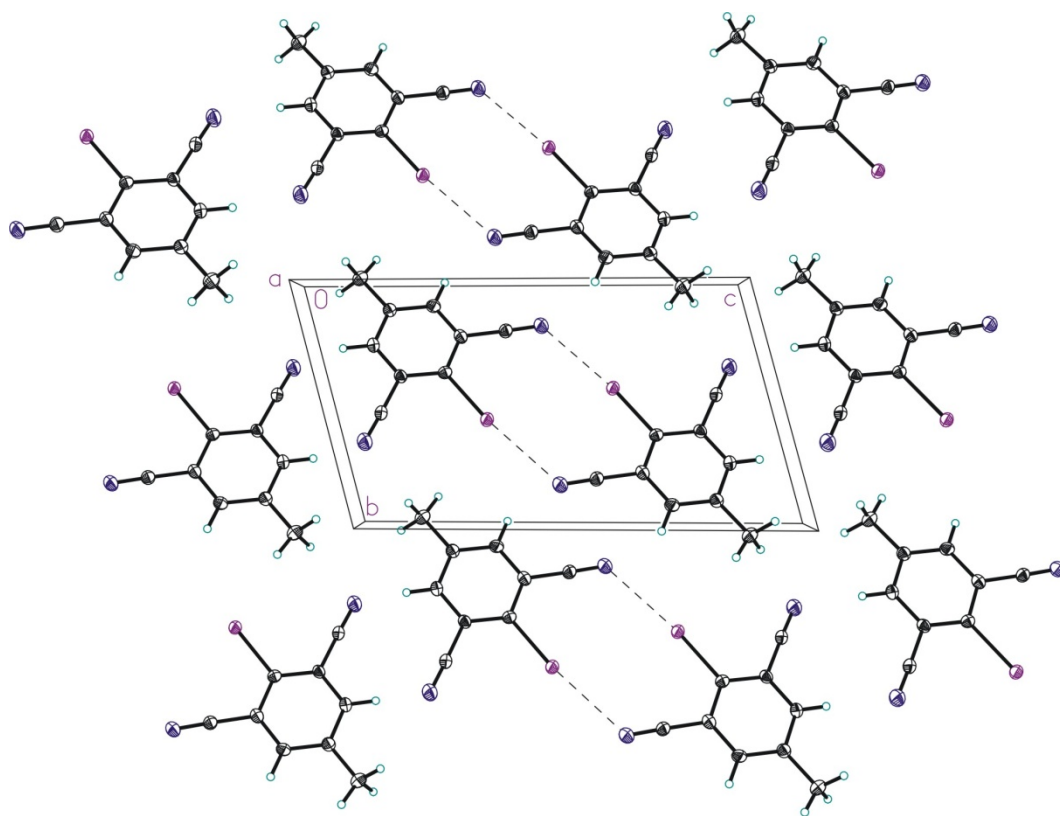
Atome	Bindungslänge [ $\text{\AA}$ ]	Atome	Bindungslänge [ $\text{\AA}$ ]
I <sub>1</sub> -C <sub>1</sub>	2.086(3)	C <sub>5</sub> -H <sub>5</sub>	0.9500
N <sub>1</sub> -C <sub>7</sub>	1.134(4)	C <sub>9</sub> -N <sub>2</sub>	1.154(4)
C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub>	1.395(4)	C <sub>9</sub> -C <sub>6</sub>	1.447(4)
C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	1.410(4)	C <sub>2</sub> -C <sub>7</sub>	1.450(4)
C <sub>3</sub> -C <sub>4</sub>	1.398(4)	C <sub>4</sub> -C <sub>8</sub>	1.513(4)
C <sub>3</sub> -C <sub>2</sub>	1.401(4)	C <sub>8</sub> -H <sub>8A</sub>	0.9800
C <sub>3</sub> -H <sub>3</sub>	0.9500	C <sub>8</sub> -H <sub>8B</sub>	0.9800
C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub>	1.393(4)	C <sub>8</sub> -H <sub>8C</sub>	0.9800
C <sub>5</sub> -C <sub>4</sub>	1.395(4)		

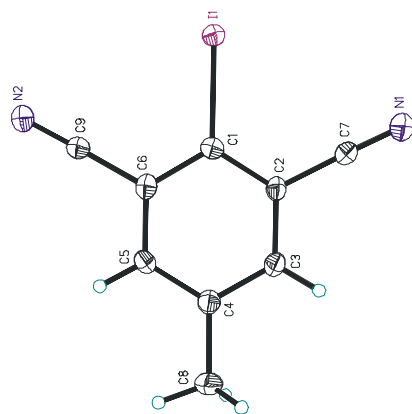
**Tabelle 10-2:** Torsionswinkel [ $^\circ$ ] der Verbindung **81**

Atome	Torsionswinkel [ $^\circ$ ]	Atome	Torsionswinkel [ $^\circ$ ]
C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	0.8(4)	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>7</sub>	178.9(2)
C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>9</sub>	-179.3(3)	I <sub>1</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>7</sub>	-1.7(3)
C <sub>2</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>5</sub>	-0.1(4)	C <sub>4</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>1</sub>	-0.3(4)
I <sub>1</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>5</sub>	-179.51(19)	C <sub>4</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>7</sub>	-179.3(2)
C <sub>2</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>9</sub>	-180.0(2)	C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>7</sub> -N <sub>1</sub>	-176(11)
I <sub>1</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>9</sub>	0.6(3)	C <sub>3</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>7</sub> -N <sub>1</sub>	3(12)
N <sub>2</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>5</sub>	14(10)	C <sub>6</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>4</sub> -C <sub>3</sub>	-1.3(4)
N <sub>2</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	-167(10)	C <sub>6</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>4</sub> -C <sub>8</sub>	178.4(3)
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub>	-0.2(4)	C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub>	1.0(4)
I <sub>1</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub>	179.22(19)	C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>4</sub> -C <sub>8</sub>	-178.7(3)

**Tabelle 10-3:** Bindungswinkel [°] der Verbindung **81**

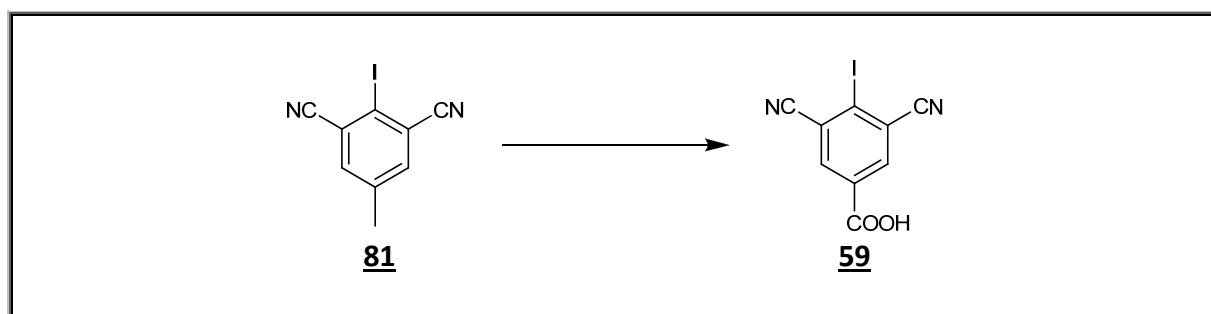
Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungswinkel [°]
C <sub>2</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	117.3(2)	C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub>	121.3(2)
C <sub>2</sub> -C <sub>1</sub> -I <sub>1</sub>	121.79(19)	C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>7</sub>	120.6(2)
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -I <sub>1</sub>	120.92(19)	C <sub>3</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>7</sub>	118.0(2)
C <sub>4</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>2</sub>	121.0(2)	N <sub>1</sub> -C <sub>7</sub> -C <sub>2</sub>	178.4(3)
C <sub>4</sub> -C <sub>3</sub> -H <sub>3</sub>	119.5	C <sub>5</sub> -C <sub>4</sub> -C <sub>3</sub>	118.0(2)
C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> -H <sub>3</sub>	119.5	C <sub>5</sub> -C <sub>4</sub> -C <sub>8</sub>	121.9(2)
C <sub>6</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>4</sub>	121.1(2)	C <sub>3</sub> -C <sub>4</sub> -C <sub>8</sub>	120.1(2)
C <sub>6</sub> -C <sub>5</sub> -H <sub>5</sub>	119.4	C <sub>4</sub> -C <sub>8</sub> -H <sub>8A</sub>	109.5
C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> -H <sub>5</sub>	119.4	C <sub>4</sub> -C <sub>8</sub> -H <sub>8B</sub>	109.5
N <sub>2</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>6</sub>	178.2(3)	H <sub>8A</sub> -C <sub>8</sub> -H <sub>8B</sub>	109.5
C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	121.3(2)	C <sub>4</sub> -C <sub>8</sub> -H <sub>8C</sub>	109.5
C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>9</sub>	118.7(2)	H <sub>8A</sub> -C <sub>8</sub> -H <sub>8C</sub>	109.5
C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>9</sub>	120.0(2)	H <sub>8B</sub> -C <sub>8</sub> -H <sub>8C</sub>	109.5

**Abbildung 10-2:** Darstellung der Elementarzelle eines Einkristalls von **81**



**Abbildung 10-3:** Analytierte Kristallstruktur von **81**

#### 10.5.4 3,5-Dicyano-4-iodbenzoesäure (**59**)



2.00 g (7.46 mmol) **81** werden in 30 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelöst, langsam mit 2.50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und auf 0 °C abgekühlt. Zu dieser blass gelben Lösung tropft man nun langsam 5.55 g (18.65 mmol, 2.5 eq)  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  gelöst in 15 ml  $\text{H}_2\text{O}$  über einen Zeitraum von etwa 2 h zu. Nachdem die gesamte  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -Lösung zugetropft ist, gibt man noch 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  zu und rührt für weitere 60 min bei RT. Die nun tiefgrüne Lösung wird langsam auf 50 ml Eiswasser gegossen, mit 50 ml EtOAc versetzt und 30 min stark gerührt. Die org. Phase wird abgetrennt und die wässrige noch 4x mit je 30 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigte org. Phase wird dann 2x mit je 60 ml einer 5:1-Mischung von  $\text{H}_2\text{O}$  und konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gewaschen. Das Lösungsmittel wird evaporiert, das Rohprodukt an Kieselgel adsorbiert und an 200 g Kieselgel aufgereinigt (Laufmittel: DCM/MeOH = 4:1). Man erhält **59** als weißen Feststoff.

#### ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

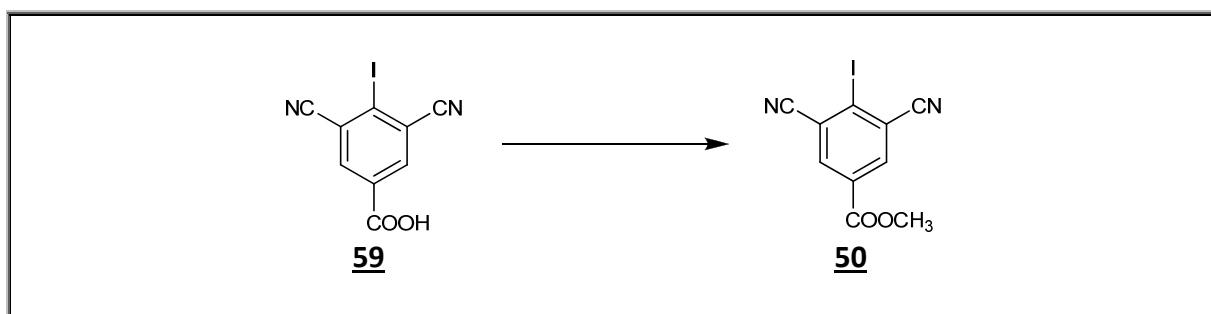
**Ausbeute:** 1.55 g (70%)

Theorie: 2.22 g



<b>DC:</b>	DCM/MeOH = 3:1	$R_f = 0.20$
<b>Schmelzpunkt:</b>	254-255 °C	Lit.: unbekannt
<b><math>^1\text{H-NMR}</math>:</b>	( $\delta$ [ppm], 250 MHz, DMSO- $d_6$ ): 14.05 (br, 1H, COOH), 8.43 (s, 2H, 2xAr-H)	
<b><math>^{13}\text{C-NMR}</math>:</b>	( $\delta$ [ppm], 60 MHz, DMSO- $d_6$ ): 164.13, 137.71, 132.37, 122.25, 118.21, 112.70	
<b>IR (KBr):</b>	3238 (m), 3076 (m), 2246 (m), 1734 (s), 1624 (w), 1586 (m), 1412 (w), 1393 (m), 1377 (m), 1265 (w), 1224 (w), 1182 (s), 1138 (w), 1126 (m), 1027 (w), 936 (w), 910 (w), 777 (w), 744 (w), 708 (w), 687 (m), 646 (w)	
<b>Masse:</b>	ESI– (berechnet für $\text{C}_9\text{H}_3\text{IN}_2\text{O}_2\text{--H}^+$ ): berechnet: 296.9 gefunden: 296.8	
<b>Elementaranalyse:</b>	$\text{C}_9\text{H}_3\text{IN}_2\text{O}_2$ berechnet: C: 36.27      H: 1.01      N: 9.40 gefunden: C: 36.65      H: 0.83      N: 9.67	

### 10.5.5 3,5-Dicyano-4-iodbenzoesäuremethylester (50)



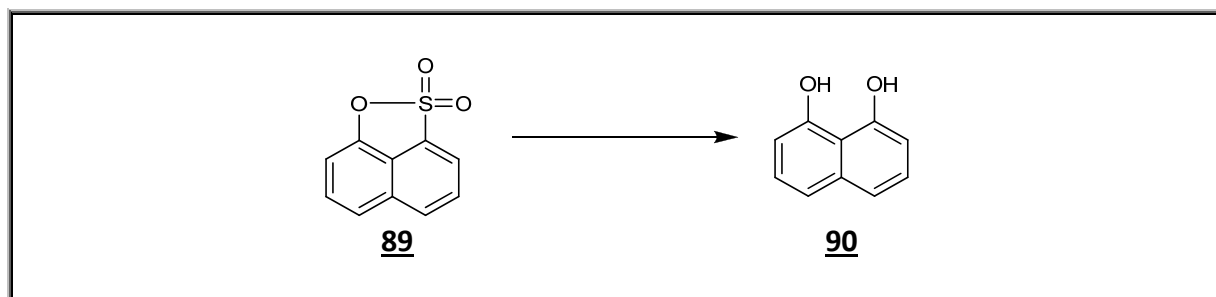
2.00 g (6.72 mmol) **59** werden in 75 ml MeOH gelöst, 10 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  hinzugefügt und für 8 h zum Rückfluss erhitzt. Die Lösung wird auf RT abgekühlt, vorsichtig mit 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und mit einer ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung auf etwa pH 3 eingestellt. Die wässrige Lösung wird 3x mit je 30 ml EtOAc extrahiert und die vereinigten org. Phasen nach Evaporation des

Lösungsmittels an Kieselgel adsorbiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an 200 g Kieselgel (Laufmittel: Hex/EtOAc = 2:1) erhält man **50** als weißen Feststoff.

#### ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

<b>Ausbeute:</b>	1.98 g (94%)	Theorie: 2.10 g
<b>DC:</b>	Hex/EtOAc = 2:1	R <sub>f</sub> = 0.33
<b>Schmelzpunkt:</b>	189 °C	Lit. <sup>[47]</sup> : 189-190 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 8.45 (s, 2H, 2xAr-H), 3.90 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> )	
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(δ[ppm], 60 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 163.27, 140.13, 136.75, 131.84, 116.29, 113.49, 52.98	
<b>IR (KBr):</b>	3058 (m), 2950 (w), 2236 (m), 1718 (s), 1588 (m), 1439 (m), 1394 (m), 1313 (m), 1233 (m), 1132 (m), 1030 (m), 992 (m), 951 (m), 891 (m), 772 (m), 762 (m), 712 (w), 639 (w)	
<b>Elementaranalyse:</b>	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> IN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	berechnet:	C: 38.49      H: 1.61      N: 8.98
	gefunden:	C: 38.76      H: 1.73      N: 9.18

#### 10.5.6 Naphtho-1,8-diol (**90**)



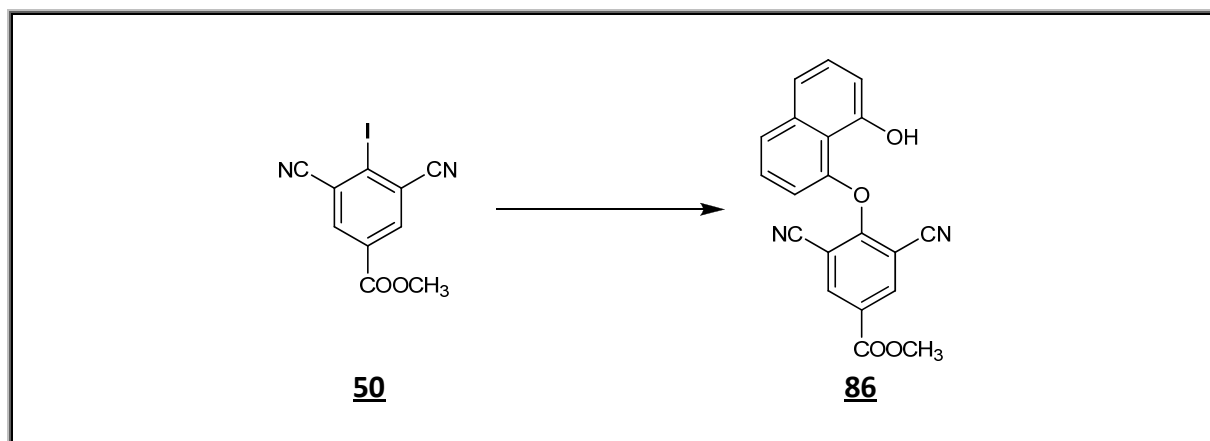
105.00 g (1.87 mol, 15.4 eq) KOH-Pellets werden auf ca. 240 °C erhitzt und zur Lösung portionsweise 50.00 g (0.242 mol) 1,8-Naphthosulton **89** (~50%ig mit Wasser befeuchtet) zugegeben. Unter starker Gasentwicklung bildet sich eine grüne Schmelze, die sich in einen

schwarzen Teer wandelt. Man erhitzt hiernach noch ca. 60 min auf 240 °C, kühlt dann ab auf 100 °C, fügt 200 ml H<sub>2</sub>O hinzu und rührt noch weitere 60 min bei 100 °C. Die Reaktionsmischung wird auf RT abgekühlt und dann mit 6 N HCl auf pH~2 eingestellt, wobei ein schwarzer Feststoff ausfällt. Dieser Feststoff wird abfiltriert und mit EtOAc nachgewaschen. Man trennt die org. Phase ab, extrahiert die wässrige Phase noch 2x mit je 150 ml EtOAc und trocknet die vereinigten org. Phasen über MgSO<sub>4</sub>. Das Lösungsmittel wird evaporiert, das Rohprodukt an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (250 g Kieselgel, Laufmittel: Hex/EtOAc = 2:1). Man erhält **90** als blass gelben Feststoff.

**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:**

<b>Ausbeute:</b>	8.88 g (46 %)	Theorie: 19.42 g
<b>DC:</b>	Hex/EtOAc = 2:1	R <sub>f</sub> = 0.40
<b>Schmelzpunkt:</b>	143 °C	Lit. <sup>[135]</sup> : 142-143 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10.84 (s, 2H, 2xOH*), 7.28-7.24 (m, 4H, 4xAr-H), 6.78-6.71 (m, 2H, 2xAr-H)	
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(δ[ppm], 60 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 153.94, 136.47, 126.77, 118.75, 114.40, 108.30	
<b>IR (KBr):</b>	3148 (s), 1909 (w), 1734 (w), 1640 (m), 1612 (s), 1585 (m), 1523 (m), 1462 (m), 1408 (s), 1377 (m), 1321 (m), 1281 (s), 1234 (s), 1204 (m), 1171 (m), 1158 (m), 1072 (w), 1032 (s), 875 (w), 856 (w), 812 (s), 757 (s), 747 (s), 631 (m), 622 (m), 596 (m)	
<b>Masse:</b>	ESI– (berechnet für C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> –H <sup>+</sup> ): berechnet: 159.1 gefunden: 158.6	
<b>Elementaranalyse:</b>	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> berechnet: C: 74.99 H: 5.03 gefunden: C: 75.24 H: 5.25	

### 10.5.7 4-(8'-Hydroxynapht-1'-yloxy)-3,5-dicyanobenzoessäuremethylester (**86**)



0.18 g (4.49 mmol, 1.4 eq) NaH (60%ige Dispersion in Mineralöl) werden unter Ar-Atmosphäre vorgelegt und mit 10 ml entgastem abs. DMF suspendiert. Zu der Suspension tropft man langsam eine Lösung von 0.77 g (4.81 mmol, 1.5 eq) Naphthodiol **90** in 8 ml entgastem abs. DMF, und rührt nach beendeter Zugabe noch 30 min bei RT.

Zu der nun gelb-braunen Lösung tropft man 1.00 g (3.20 mmol) **50** gelöst in 10 ml entgastem abs. DMF und erwärmt die rote Lösung für 30 min auf 60 °C. Die auf RT abgekühlte Lösung wird auf 50 ml eisgekühlte 2N HCl-Lösung gegossen und 2x mit je 20 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel evaporiert und der Rückstand an Kieselgel adsorbiert. Die Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch (65 g Kieselgel, Laufmittel: Hex/EtOAc = 3:1). Man erhält **86** als gelben, analysenreinen Feststoff.

#### ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

<b>Ausbeute:</b>	0.77 g (70 %)	Theorie: 1.10 g
<b>DC:</b>	Hex/EtOAc = 2:1 Hex/EtOAc = 3:1	R <sub>f</sub> = 0.28 R <sub>f</sub> = 0.16
<b>Schmelzpunkt:</b>	207 °C	Lit. <sup>[47]</sup> : 207-208 °C

**<sup>1</sup>H-NMR:** (δ[ppm], 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
 10.06 (s, 1H, Ar-OH\*), 8.56 (s, 2H, 2xAr-H), 7.86 (dd, 1H, J = 0.8 / 8.3, 1xAr-H), 7.48-7.33 (m, 4H, 4xAr-H), 6.84 (dd, 1H, J = 0.9 / 7.6, 1xAr-H), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>)

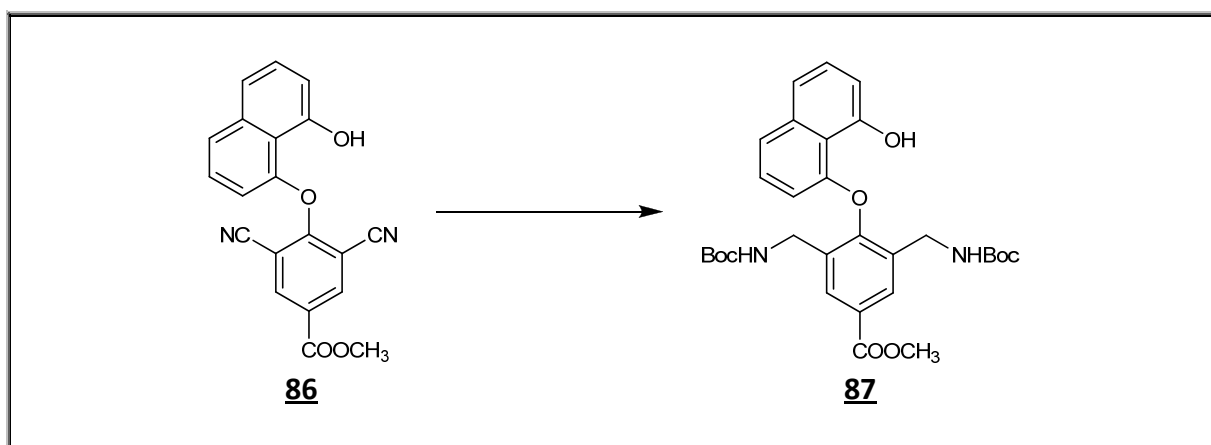
**$^{13}\text{C}$ -NMR:** ( $\delta$ [ppm], 60 MHz, DMSO- $d_6$ ):  
163.50, 163.02, 152.22, 149.06, 140.02, 136.72, 127.42, 125.56, 124.27,  
118.97, 117.95, 117.50, 113.46, 110.65, 103.27, 52.75

**IR (KBr):** 3510 (m), 3084 (m), 2957 (w), 2238 (m), 1733 (s), 1712 (m), 1629 (w),  
1610 (m), 1597 (m), 1578 (m), 1458 (m), 1433 (s), 1395 (s), 1352 (m),  
1315 (s), 1285 (m), 1234 (s), 1213 (s), 1195 (s), 1107 (m), 1021 (s), 987  
(m), 933 (w), 903 (w), 821 (m), 760 (s), 724 (m), 614 (w)

**Masse:** ESI– (berechnet für  $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{--H}^+$ ):  
berechnet: 343.1  
gefunden: 343.1

**Elementaranalyse:**  $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$   
berechnet: C: 69.76 H: 3.51 N: 8.14  
gefunden: C: 69.53 H: 3.62 N: 7.95

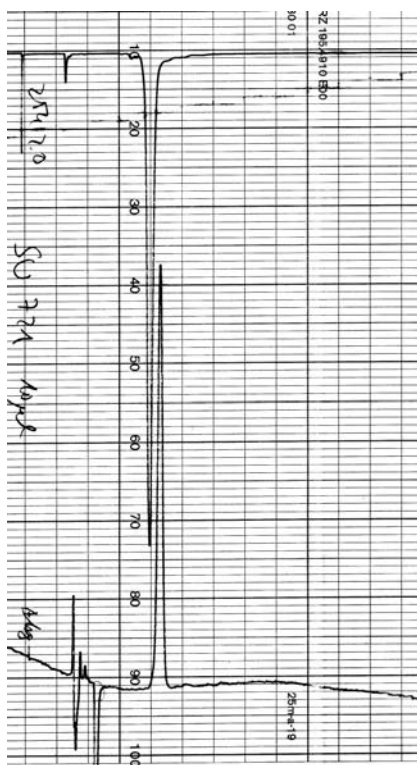
#### 10.5.8 4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-(*tert*butoxycarbonylamino-methyl)-benzoesäuremethylester (**87**)



0.178 g (0.52 mmol) **86** werden zu einer Mischung von 0.065 g Pd/C (10%ig), 0.03 g  $\text{PtO}_2$  (Adams-Katalysator) und 0.34 g (1.56 mmol, 3 eq)  $\text{Boc}_2\text{O}$  in 20 ml abs. MeOH gegeben und bei 45 bar  $\text{H}_2$ -Druck und 55 °C für 24 h gerührt. Die Suspension wird auf RT abgekühlt, über Celite filtriert und das Lösungsmittel evaporiert. Der Rückstand wird an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (60 g Kieselgel, Laufmittel Hex/EtOAc = 4:1). Man erhält **87** als weißen Schaum.

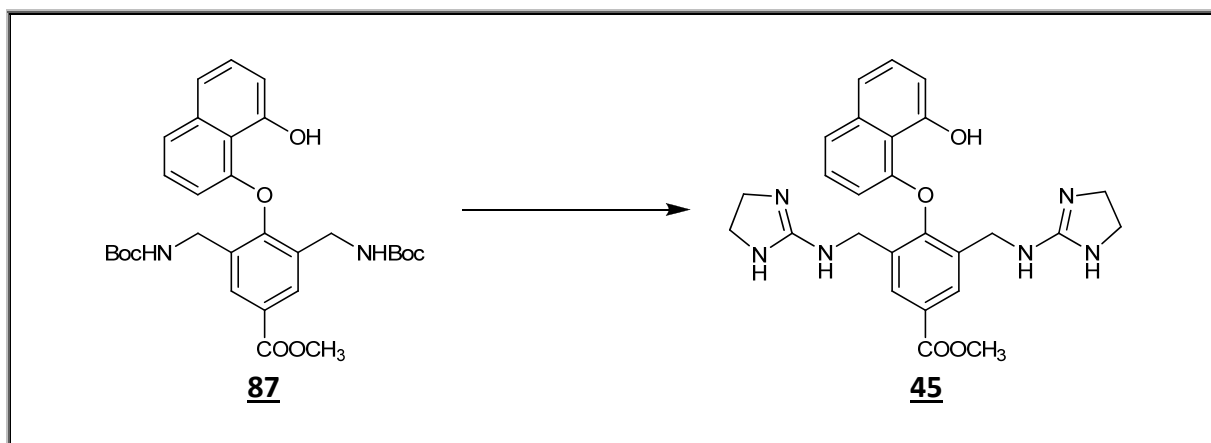
**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:**

<b>Ausbeute:</b>	0.22 g (69%)	Theorie: 0.32 g
<b>DC:</b>	Hex/EtOAc = 3:1	R <sub>f</sub> = 0.34
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 9.50 (s, 1H, OH*), 7.89 (s, 2H, 2x Ar-H), 7.51 (dd, 1H, J = 0.8 / 8.3, Naphthyl-H), 7.42-7.35 (m, 4H, 2x Naphthyl-H / 2x NH*), 7.21 (t, 1H, J = 7.9, Naphthyl-H), 6.94 (m, 1H, Naphthyl-H), 6.22 (d, 1H, J = 7.5, Naphthyl-H), 4.21 (dd, 2H, J = 5.4 / 16.6, Ar-CH <sub>2</sub> , D <sub>2</sub> O: dd→d), 3.93-3.84 (m, 5H, Ar-CH <sub>2</sub> / COOCH <sub>3</sub> ), 1.36 (s, 18H, 2x OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )	
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(δ[ppm], 75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 165.60, 155.62, 153.75, 153.39, 152.25, 137.01, 133.40, 127.48, 126.50, 125.76, 122.32, 118.63, 114.69, 110.81, 106.76, 78.00, 52.05, 38.19, 27.99	
<b>IR (KBr):</b>	3467 (m), 3373 (m), 3058 (w), 2977 (m), 2931 (m), 1721 (s), 1634 (w), 1606 (m), 1581 (m), 1514 (s), 1456 (m), 1437 (m), 1394 (s), 1367 (s), 1314 (s), 1298 (s), 1249 (s), 1221 (s), 1169 (s), 1117 (m), 1078 (w), 1049 (m), 1026 (s), 1001 (w), 968 (w), 941 (w), 901 (w), 862 (w), 834 (w), 818 (m), 773 (m), 756 (m)	
<b>Masse:</b>	ESI+ (berechnet für C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> +H <sup>+</sup> ): berechnet: 553.3 gefunden: 570.4 (100.00, M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) 553.4 (35.89, M+H <sup>+</sup> ) 497.0 (25.33, M+H <sup>+</sup> , - <sup>t</sup> Bu) 453.3 (13.28, M+H <sup>+</sup> , -Boc) 440.9 (21.00, M+H <sup>+</sup> , - 2 <sup>t</sup> Bu) 397.0 (63.19, M+H <sup>+</sup> , -Boc, - <sup>t</sup> Bu)	
<b>Elementaranalyse:</b>	C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> berechnet: C: 65.20                    H: 6.57                    N: 5.07 Eine korrekte Elementaranalyse konnte auch nach HPLC-Aufreinigung nicht erhalten werden.	



**Abbildung 10-4:** Isokratische HPLC-Analytik von **87** (Hex / MeOAc = 10:3). Die obere Spur zeigt den UV-Kanal, die untere den Brechungsindex.

### 10.5.9 4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-[(4'',5''-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-benzoesäuremethylester (**45**)



2 ml abs. MeOH werden auf 0 °C gekühlt und langsam 1 ml Acetylchlorid zugetropft. Die entstehende Lösung wird noch weitere 30 min bei 0 °C gerührt, anschließend eine Lösung von 0.05 g (0.09 mmol) **87** in 0.5 ml abs. MeOH zugegeben, dann 30 min bei 0 °C und weitere 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird evaporiert und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Das entschützte Diamin wird nun mit 3 ml einer 2:1-Mischung von MeOH und

NEt<sub>3</sub> aufgenommen, 0.041 g (0.27 mmol, 3 eq) **93** zugegeben, und die Lösung für 1 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird direkt an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (20 g Kieselgel, Laufmittel EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O/HOAc = 11:4:4:1). Nach Evaporation des Lösungsmittels wird der Rückstand in MeOH aufgenommen und mit 0.138 g (0.36 mmol, 4 eq) Pikrinsäure versetzt. Man gibt bis zum Auftreten einer intensiven Trübung Wasser hinzu, kocht diese Suspension nochmals auf, und lagert die gelbe Lösung nach dem Erkalten über Nacht bei 4 °C. Der Niederschlag wird abfiltriert, im Vakuum getrocknet, in MeOH aufgelöst und durch eine etwa 5 cm lange Ionenaustauscher-Säule (Dowex 1x8, Cl<sup>-</sup>-Form) laufen gelassen. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Trocknen im Vakuum erhält man **45** als gelbbraunen Feststoff als Dichlorid.

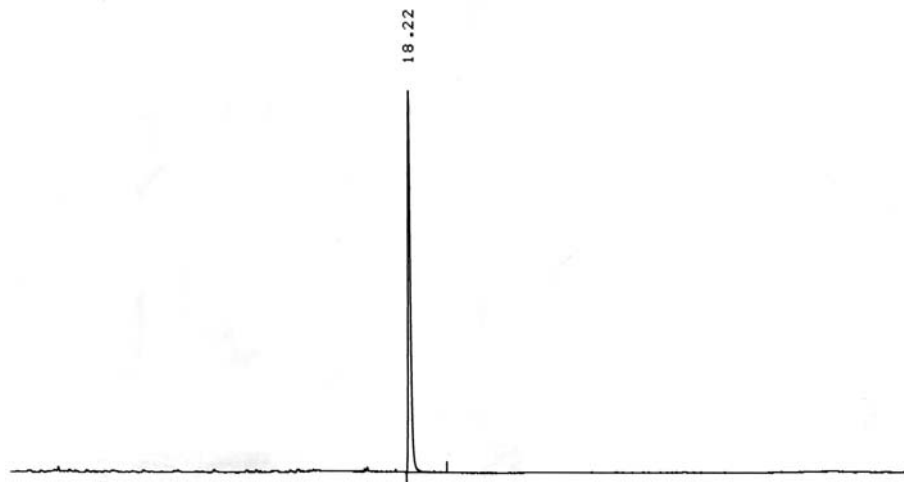
#### ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

<b>Ausbeute:</b>	0.021 g (53 %)	Theorie: 0.04 g
<b>DC:</b>	EtOAc/EtOH/H <sub>2</sub> O/HOAc = 11:4:4:1    R <sub>f</sub> = 0.30	
<b>Schmelzpunkt:</b>	189-191 °C	Lit.: unbekannt
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 9.91 (s, 1H, Aryl-OH*), 8.75-8.67 (m, 2H, 2x Benzyl-NH*), 8.50-8.00 (br + s, 6H, 4x Dihydroimidazol-NH / 2x Benzol-H), 7.54 (d, 1H, J = 7.9, Naphthyl-H), 7.41 (m, 2H, Naphthyl-H), 7.22 (t, 1H, J = 8.0, Naphthyl-H), 7.10-7.02 (m, 1H, Naphthyl-H), 6.22 (dd, 1H, J = 1.4 / 7.6, Naphthyl-H), 4.44-4.25 (m, 4H, 2x Benzol-CH <sub>2</sub> ), 3.92 (s, 3H, COOCH <sub>3</sub> ), 3.43 (s, 8H, 4x Dihydroimidazol-CH <sub>2</sub> )	
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(δ[ppm], 60 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 165.31, 159.38, 153.67, 153.31, 153.20, 137.04, 131.52, 130.03, 127.51, 127.12, 125.94, 122.57, 118.67, 114.99, 111.36, 107.31, 52.37, 42.29, 40.80 Bei unvollständigem Ionentausch sichtbar: 173.19, 22.03 (Essigsäure)	
<b>IR (KBr):</b>	3411 (m), 3158 (s), 3053 (s), 1723 (s), 1670 (s), 1603 (s), 1578 (s), 1490 (w), 1456 (m), 1436 (m), 1386 (m), 1355 (m), 1317 (s), 1289 (s), 1222 (s), 1197 (s), 1070 (m), 1025 (m), 1004 (m), 932 (w), 902 (w), 819 (m), 758 (m), 706 (m), 632 (m)	

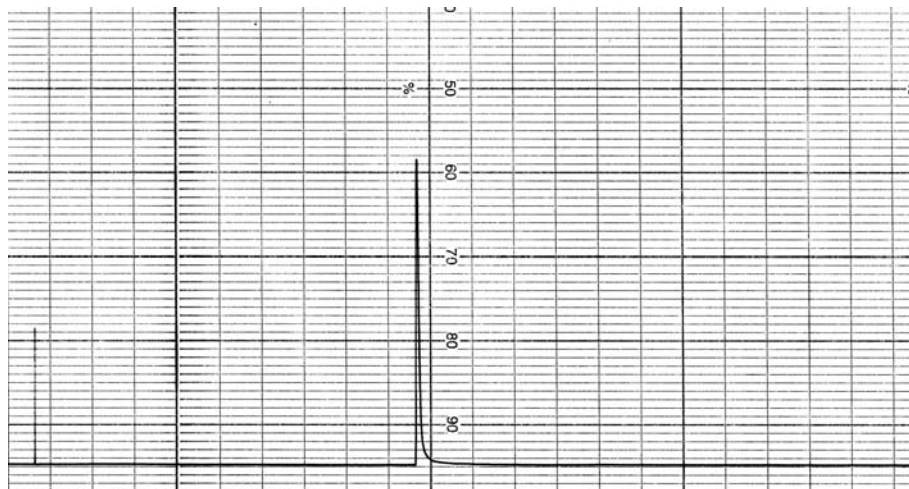


**Masse:** ESI+ (berechnet für  $C_{26}H_{28}N_6O_4 + H^+$ ):  
berechnet: 489.2  
gefunden: 489.3 (100.00,  $M+H^+$ )  
245.0 (70.29,  $M+2H^+$ )

**Elementaranalyse:**  $C_{26}H_{30}Cl_2N_6O_4$   
berechnet: C: 55.62                      H: 5.39                      N: 14.97  
Eine korrekte Elementaranalyse konnte auch nach HPLC-Aufreinigung nicht erhalten werden (siehe *Abbildung 10-5* und *Abbildung 10-6*).

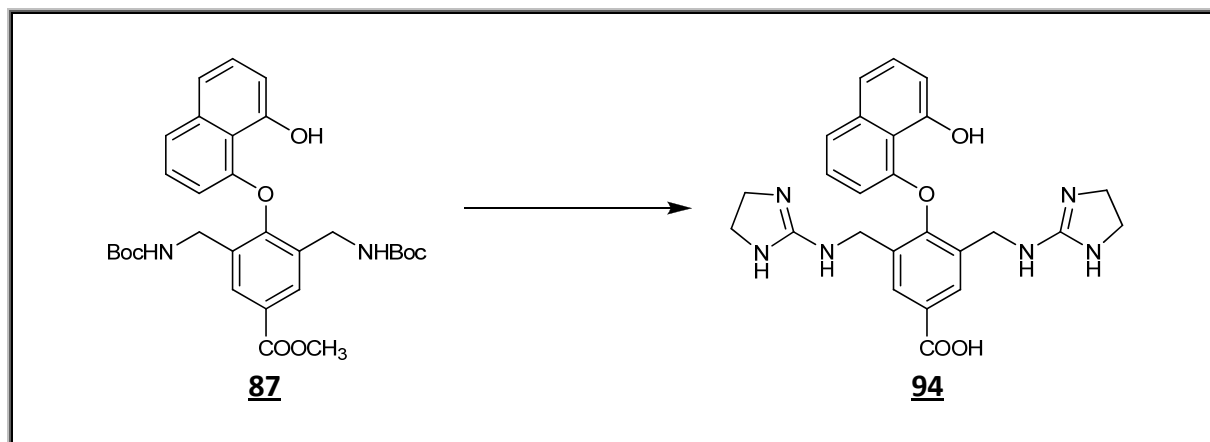


**Abbildung 10-5:** Analytische HPLC-Übersichtsmessung (ELSD-Spur, Start links im Bild) von 45.



**Abbildung 10-6:** Analytische HPLC-Übersichtsmessung (UV-Spur, Start links im Bild) von 45.

### 10.5.10 4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-[(4'',5''-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-methyl]-benzoesäure (**94**)

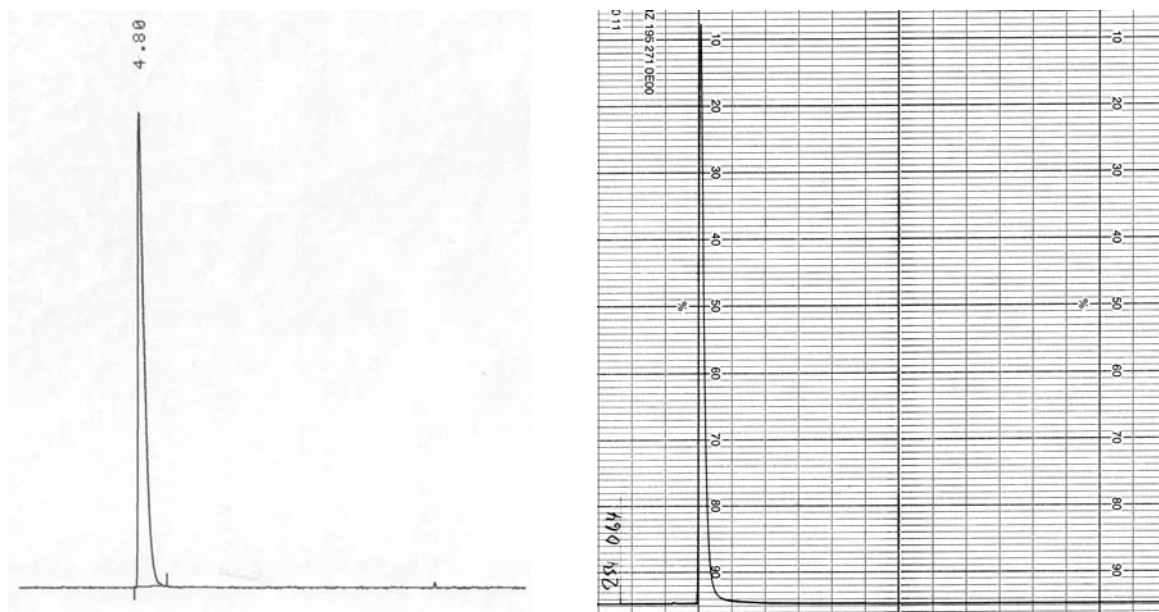


2 ml abs. MeOH werden auf 0 °C gekühlt und langsam 1 ml Acetylchlorid zugetropft. Die entstehende Lösung wird noch weitere 30 min bei 0 °C gerührt, anschließend eine Lösung von 0.05 g (0.09 mmol) **87** in 0.5 ml abs. MeOH zugegeben, dann 30 min bei 0 °C und weitere 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird evaporiert und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Das entschützte Diamin wird dann mit 2 ml einer 1:1:1-Mischung von MeOH, NEt<sub>3</sub> und H<sub>2</sub>O aufgenommen, 0.041 g (0.27 mmol, 3 eq) **93** zugegeben, und die Lösung für 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 5 ml einer 1n NaOH-Lösung verdünnt und 3x mit je 10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die wässrige Phase wird auf etwa die Hälfte des Volumens eingeeengt, dann mit 2n HCl auf etwa pH 3 angesäuert und komplett getrocknet. Der zurückbleibende Feststoff wird 3x mit je 5 ml abs. MeOH ausgekocht, und die überstehende Lösung jeweils kalt filtriert. Die methanolische Phase wird mit 0.138 g (0.36 mmol, 4 eq) Pikrinsäure versetzt und anschließend so lange Wasser zugegeben, bis eine intensive Trübung auftritt. Diese Mischung wird nochmals aufgeköcht und dann nach dem Erkalten auf RT über Nacht bei 4 °C gelagert. Der Niederschlag wird abfiltriert, im Vakuum getrocknet, in MeOH aufgelöst und durch eine etwa 5 cm lange Ionenaustauscher-Säule (Dowex 1x8, Cl<sup>-</sup>-Form) laufen gelassen. Nach Evaporation des Lösungsmittels erhält man **94** als gelbbraunen Feststoff in Form eines Dihydrochlorids.

#### ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

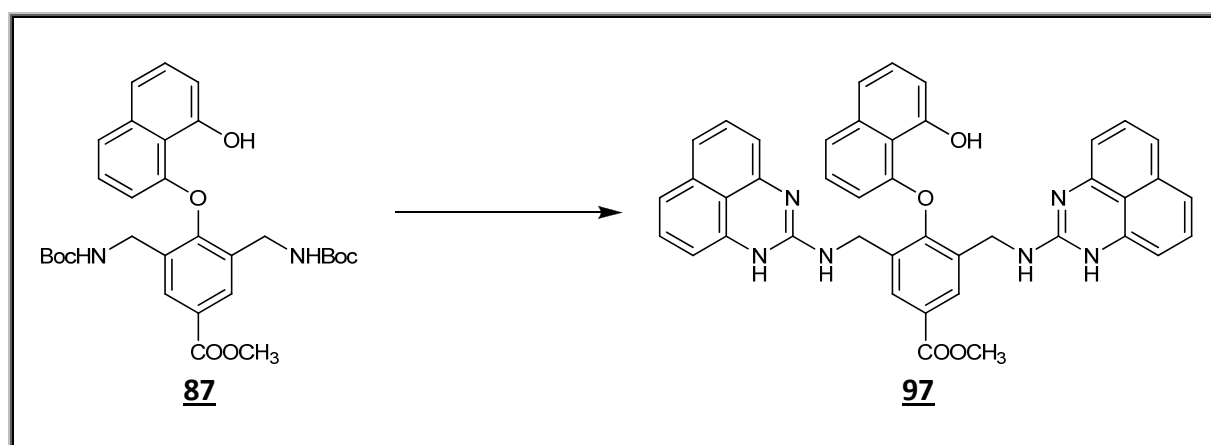
<b>Ausbeute:</b>	0.029 g (59 %)	Theorie: 0.049 g
<b>DC:</b>	EtOAc/EtOH/H <sub>2</sub> O/HOAc = 11:4:4:1	R <sub>f</sub> = 0.11
<b>Schmelzpunkt:</b>	197-199 °C	Lit.: unbekannt

- $^1\text{H}$ -NMR:** ( $\delta$ [ppm], 250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  
13.33 (br, 1H, COOH), 9.85 (s, 1H, Aryl-OH\*), 8.67 (t, 2H,  $J = 5.8$ , 2x Benzyl-NH\*), 8.50-7.90 (br + s, 6H, 4x Dihydroimidazol-NH / 2x Benzol-H), 7.55 (d, 1H,  $J = 8.2$ , Naphthyl-H), 7.42 (m, 2H, Naphthyl-H), 7.22 (t, 1H,  $J = 8.0$ , Naphthyl-H), 7.06 (m, 1H, Naphthyl-H), 6.23 (d, 1H,  $J = 7.7$ , Naphthyl-H), 4.42-4.26 (m, 4H, 2x Benzol-CH<sub>2</sub>), 3.44 (s, 8H, 4x Dihydroimidazol-CH<sub>2</sub>)
- $^{13}\text{C}$ -NMR:** ( $\delta$ [ppm], 60 MHz, MeOH- $d_4$ ):  
168.27, 160.65, 155.32, 155.03, 154.94, 138.98, 133.42, 132.18, 130.91, 129.11, 127.23, 124.56, 120.70, 116.28, 112.33, 108.73, 43.88, 43.20
- IR (KBr):** 3168 (s), 3049 (m), 1667 (s), 1602 (s), 1578 (m), 1456 (m), 1430 (m), 1389 (m), 1353 (m), 1286 (m), 1221 (m), 1189 (s), 1117 (m), 1065 (m), 1025 (m), 931 (w), 819 (m), 801 (w), 777 (w), 758 (m), 689 (m), 618 (m)
- Masse:** ESI+ (berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>+H<sup>+</sup>):  
berechnet: 475.2  
gefunden: 475.1 (M+H<sup>+</sup>)  
238.1 (M+2H<sup>+</sup>)
- Elementaranalyse:** C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>  
berechnet: C: 54.85 H: 5.16 N: 15.35  
Eine korrekte Elementaranalyse konnte auch nach HPLC-Aufreinigung nicht erhalten werden.



**Abbildung 10-7:** Analytische HPLC-Übersichtsmessung einer semipräparativ aufgereinigten Probe von **94**. Links zu sehen ist die ELSD-Aufnahme, rechts das UV-Chromatogramm (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN = 78:22).

#### 10.5.11 4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-[(2''-perimidinylamino)-methyl]-benzoesäuremethylester (**97**)



2 ml abs. MeOH werden auf 0 °C gekühlt und langsam 1 ml Acetylchlorid zugetropft. Die entstehende Lösung wird noch weitere 30 min bei 0 °C gerührt, und dann eine Lösung von 0.025 g (0.045 mmol) **87** in 0.5 ml abs. MeOH zugegeben, dann 30 min bei 0 °C und weitere 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird evaporiert und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Das entschützte Diamin wird dann mit 1 ml abs. EtOH und 0.014 ml (0.099 mmol, 2.2 eq) TEA aufgenommen. Nach Zugabe von 0.028 g (0.14 mmol, 3 eq) **96** wird die Lösung für 3 h zum Sieden erhitzt. Die auf RT abgekühlte Lösung wird an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (50 g Kieselgel, Laufmittel: EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O/HOAc =

15:2:2:1). Das vorgereinigte Produkt wird dann nochmals HPLC-gereinigt (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN = 50:50), das Produkt mit MeOH aufgenommen und ein Ionen-Austausch durchgeführt (5 cm Dowex 1x8-Säule (Cl<sup>-</sup>-Form)). Nach Evaporation des Lösungsmittels erhält man 97 als beige-farbenen Feststoff.

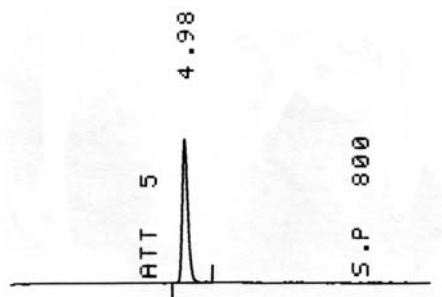
#### ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

<b>Ausbeute:</b>	0.017 g (57 %)	Theorie: 0.03 g
<b>DC:</b>	EtOAc/EtOH/H <sub>2</sub> O/HOAc = 15:2:2:1   R <sub>f</sub> = 0.53	
<b>Schmelzpunkt:</b>	> 350 °C	Lit.: unbekannt
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 11.41 (br, 4H, 4x Perimidin-NH*), 9.48 (br, 1H, Aryl-OH*), 8.67 (br, 2H, 2x Benzyl-NH*), 8.27 (s, 2H, 2x Benzol-H), 7.30-7.10 (m, 10H, 8x Perimidinyl-H / 2x Naphthyl-H), 7.01-6.86 (m, 2H, 2x Naphthyl-H), 6.70 (m, 4H, 4x Perimidinyl-H), 6.56 (dd, 1H, J = 1 / 7.2, Naphthyl-H), 6.37 (m, 1H, Naphthyl-H), 4.75 (d, 4H, J = 5.2, 2x Benzol-CH <sub>2</sub> ), 3.90 (s, 3H, COOCH <sub>3</sub> )	
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(δ[ppm], 75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 165.26, 153.54, 153.35, 153.16, 148.90, 136.67, 133.44, 132.47, 132.38, 131.00, 130.91, 127.81, 127.31, 126.78, 125.67, 122.42, 120.10, 118.18, 115.10, 114.42, 110.91, 107.41, 106.58, 52.32, 40.31	
<b>IR (KBr):</b>	3318 (m), 3176 (m), 3050 (m), 3004 (m), 2926 (m), 1722 (m), 1665 (s), 1595 (s), 1578 (m), 1534 (m), 1479 (m), 1466 (m), 1434 (m), 1422 (m), 1383 (s), 1354 (m), 1316 (m), 1270 (m), 1237 (m), 1221 (m), 1198 (s), 1183 (m), 1171 (m), 1117 (m), 1053 (m), 1024 (m), 905 (w), 850 (w), 816 (s), 767 (s), 700 (m), 614 (m)	
<b>Masse:</b>	ESI+ (berechnet für C <sub>42</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> +H <sup>+</sup> ): berechnet:     685.3 gefunden:     685.4 (40.13, M+H <sup>+</sup> ) 343.2 (100.00, M+2H <sup>+</sup> )	

**Elementaranalyse:**  $C_{42}H_{34}Cl_2N_6O_4$

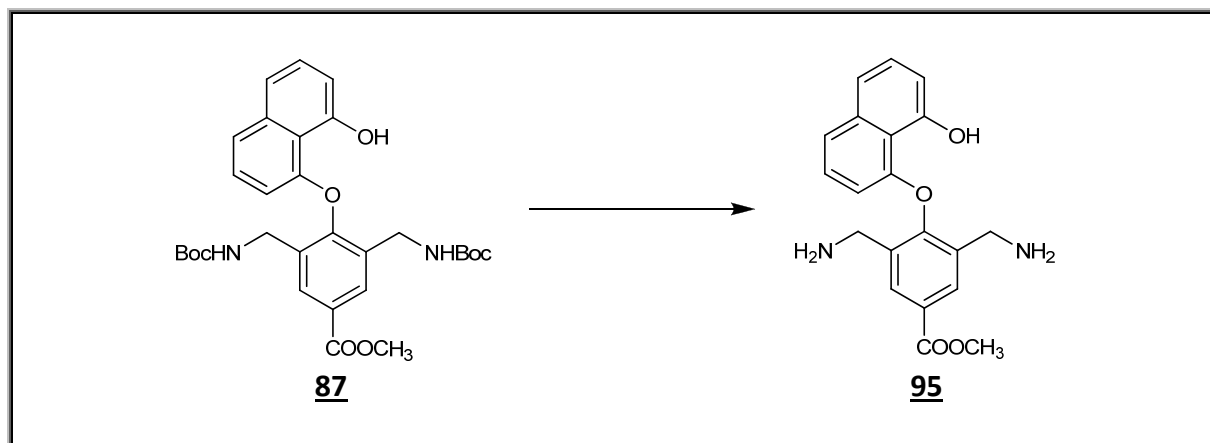
berechnet: C: 66.58 H: 4.52 N: 11.09

Eine korrekte Elementaranalyse konnte auch nach HPLC-Aufreinigung nicht erhalten werden (siehe *Abbildung 10-8*)



**Abbildung 10-8:** ELSD-Spur einer isokratischen HPLC-Analytik von **97** (0.1% TFA in  $H_2O$  /  $CH_3CN$  = 50:50). Die Substanz ist vorher semipräparativ aufgereinigt worden (0.1% TFA in  $H_2O$  /  $CH_3CN$  = 50:50).

#### 10.5.12 4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-(aminomethyl)-benzoesäure-methylester (**95**)



2 ml abs. MeOH werden auf 0 °C gekühlt und langsam 1 ml Acetylchlorid zugetropft. Die entstehende Lösung wird noch weitere 30 min bei 0 °C gerührt, und dann eine Lösung von 0.05 g (0.09 mmol) **87** in 0.5 ml abs. MeOH zugegeben, dann 30 min bei 0 °C und weitere 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird evaporiert und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird dann per HPLC semipräparativ aufgereinigt (0.1% TFA in  $H_2O$  /  $CH_3CN$  = 80:20) und anschließend im Vakuum getrocknet. Die Substanz wird mit MeOH aufgenommen und ein Ionen-Austausch durchgeführt (5 cm Dowex 1x8-Säule ( $Cl^-$ -Form)). Nach Evaporation des Lösungsmittels erhält man **95** als farblosen Feststoff.

**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:**

**Ausbeute:** 0.27 g (71 %) Theorie: 0.038 g

**DC:** EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O/HOAc = 11:4:4:1  $R_f = 0.25$

**Schmelzpunkt:** 176-178 °C Lit.: unbekannt

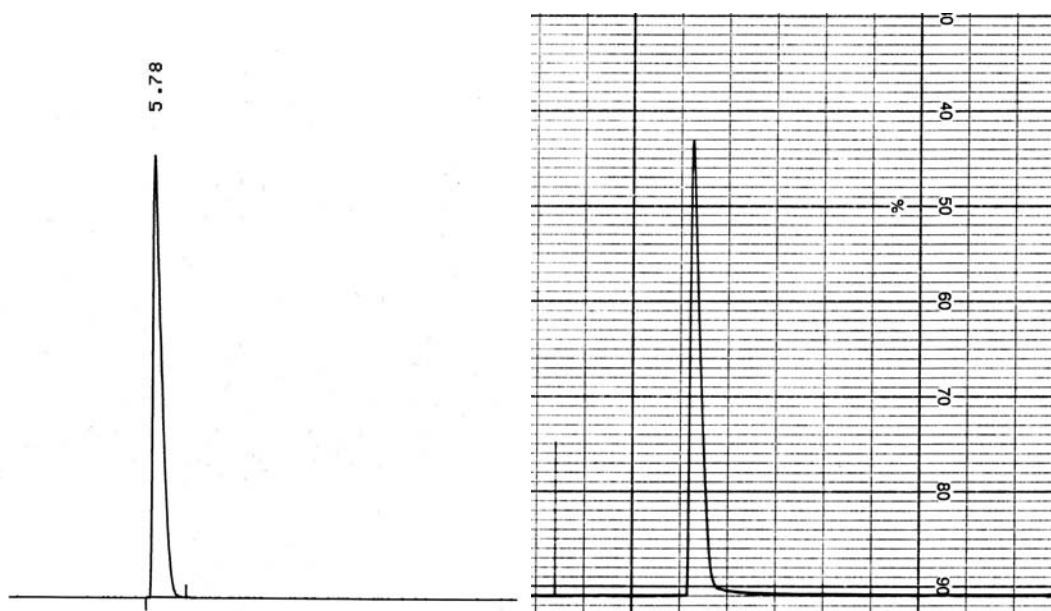
**<sup>1</sup>H-NMR:** (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
9.84 (br, 1H, Aryl-OH\*), 8.65 (br, 6H, 2x Benzyl-NH<sub>3</sub>\*), 8.36 (s, 2H, 2x Benzol-H), 7.58 (dd, 1H,  $J = 0.7 / 8.3$ , Naphthyl-H), 7.43 (m, 2H, 2x Naphthyl-H), 7.23 (t, 1H,  $J = 8.1$ , Naphthyl-H), 7.05 (m, 1H, Naphthyl-H), 6.29 (dd, 1H,  $J = 0.7 / 7.6$ , Naphthyl-H), 4.10-3.80 (m, 7H, 2x Benzol-CH<sub>2</sub> / COOCH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR:** (δ[ppm], 60 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
165.15, 153.43, 153.25, 153.01, 137.14, 131.00, 128.61, 127.79, 127.14, 125.87, 123.17, 118.95, 114.71, 111.54, 107.48, 52.46, 36.75

**IR (KBr):** 3434 (m), 2953 (s), 2615 (m), 1785 (w), 1719 (s), 1602 (s), 1579 (s), 1499 (m), 1478 (m), 1438 (s), 1389 (s), 1319 (s), 1284 (m), 1242 (s), 1203 (s), 1024 (s), 999 (m), 968 (w), 921 (w), 901 (w), 820 (m), 757 (m), 722 (w), 682 (w)

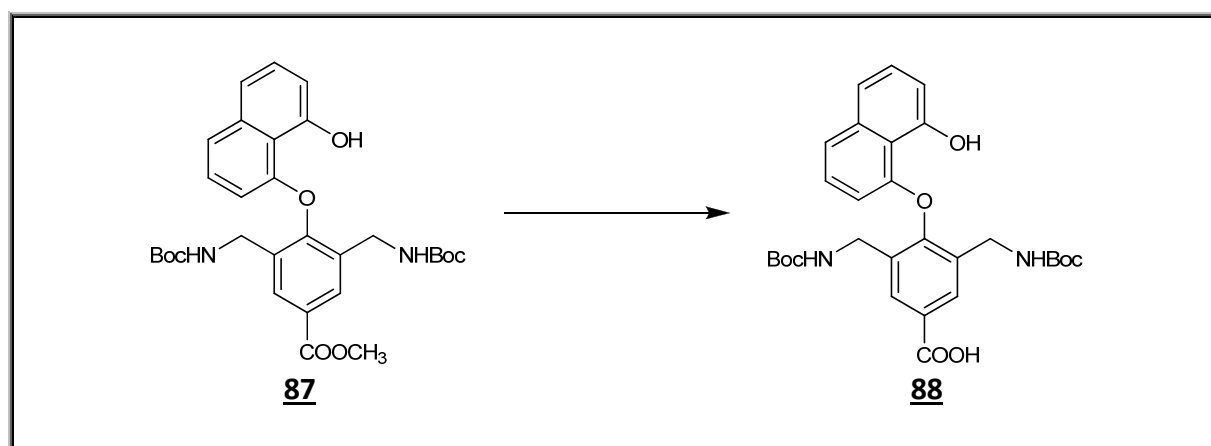
**Masse:** ESI+ (berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>+H<sup>+</sup>):  
berechnet: 353.1  
gefunden: 353.0 (M+H<sup>+</sup>)

**Elementaranalyse:** C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
berechnet: C: 56.48 H: 5.21 N: 6.59  
Eine korrekte Elementaranalyse konnte auch nach HPLC-Aufreinigung nicht erhalten werden (siehe *Abbildung 10-10*)



**Abbildung 10-9:** Analytische HPLC-Übersichtsmessung einer semipräparativ aufgereinigten Probe von **95**. Links zu sehen ist die ELSD-Aufnahme, rechts das UV-Chromatogramm (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN = 80:20).

### 10.5.13 4-(8'-Hydroxynaphth-1'-yloxy)-3,5-bis-(*tert*butoxycarbonylamino-methyl)-benzoesäure (**88**)



0.250 g (0.45 mmol) **87** werden in 30 ml einer 3:1-Mischung von MeOH und H<sub>2</sub>O gelöst, 0.095 g (2.26 mmol, 5 eq) LiOH·H<sub>2</sub>O hinzu gegeben, und die Lösung dann für 3 h bei 60 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 20 ml einer 1n HCl-Lösung aufgenommen und 2x mit je 20 ml DCM extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert, das Rohprodukt an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (50 g Kieselgel, Laufmittel: DCM/MeOH = 9:1). Man erhält **88** als braunen Feststoff.



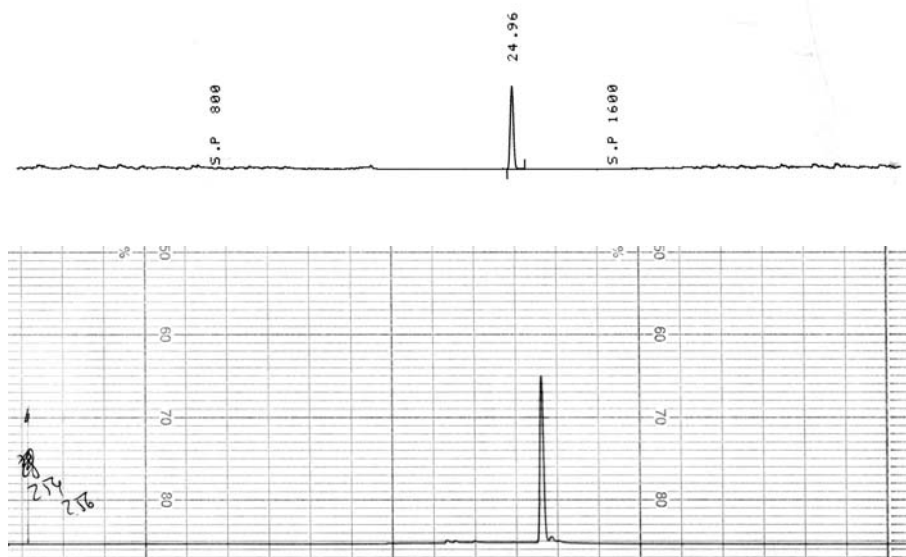
**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:**

<b>Ausbeute:</b>	0.21 g (88 %)	Theorie: 0.24 g
<b>DC:</b>	DCM/MeOH = 9:1 + 1% HOAc	R <sub>f</sub> = 0.28
<b>Schmelzpunkt:</b>	141-142 °C	Lit. <sup>[47]</sup> : 140-141 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 13.00 (br, 1H, COOH), 9.48 (s, 1H, OH*), 7.88 (s, 2H, 2x Ar-H), 7.50 (d, 1H, J = 0.8 / 8.3, Naphthyl-H), 7.40-7.33 (m, 4H, 2x Naphthyl-H, 2x NH*), 7.22 (t, 1H, J = 8.0, Naphthyl-H), 6.94 (m, 1H, Naphthyl-H), 6.23 (d, 1H, J = 7.6, Naphthyl-H), 4.21 (dd, 2H, J = 5.4 / 16.5, Ar-CH <sub>2</sub> , D <sub>2</sub> O: dt→t), 3.89 (dd, 2H, J = 6.3 / 16.6, Ar-CH <sub>2</sub> ), 1.36 (s, 18H, 2xOC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )	
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(δ[ppm], 75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 166.67, 155.60, 153.76, 153.46, 151.87, 137.01, 133.11, 127.71, 127.47, 125.79, 122.26, 118.64, 114.67, 110.79, 106.73, 77.96, 38.19, 28.01	
<b>IR (KBr):</b>	3458 (m), 3365 (m), 3059 (m), 2978 (m), 2933 (m), 1701 (s), 1606 (m), 1581 (m), 1514 (m), 1456 (m), 1431 (m), 1395 (s), 1368 (s), 1289 (s), 1250 (s), 1218 (m), 1182 (s), 1169 (s), 1117 (m), 1048 (m), 1026 (m), 941 (w), 905 (w), 859 (w), 818 (m), 778 (m), 756 (m), 722 (w), 706 (w), 618 (w)	
<b>Masse:</b>	ESI+ (berechnet für C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> +H <sup>+</sup> ): berechnet: 539.2 gefunden: 561.2 (64.89, M+Na <sup>+</sup> ) 556.2 (37.67, M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) 539.2 (31.15, M+H <sup>+</sup> ) 483.3 (36.41, M+H <sup>+</sup> , - <sup>t</sup> Bu) 439.3 (32.55, M+H <sup>+</sup> , -Boc) 427.0 (30.50, M+H <sup>+</sup> , -2 <sup>t</sup> Bu) 383.0 (100.00, M+H <sup>+</sup> , -Boc, - <sup>t</sup> Bu)	

**Elementaranalyse:**  $C_{29}H_{34}N_2O_8$

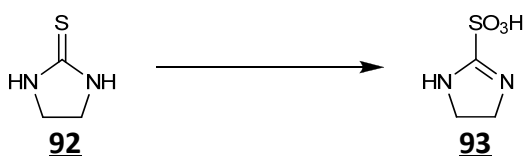
berechnet: C: 64.67 H: 6.36 N: 5.20

Eine korrekte Elementaranalyse konnte für Molekül **88** nicht erhalten werden.



**Abbildung 10-10:** ELSD-Spur (oben) und UV-Aufnahme (unten) einer analytischen HPLC-Übersichtsmessung von **88**. Die Substanz ist vorher semipräparativ aufgereinigt worden (0.1% TFA in  $H_2O$  /  $CH_3CN$  = 32:68).

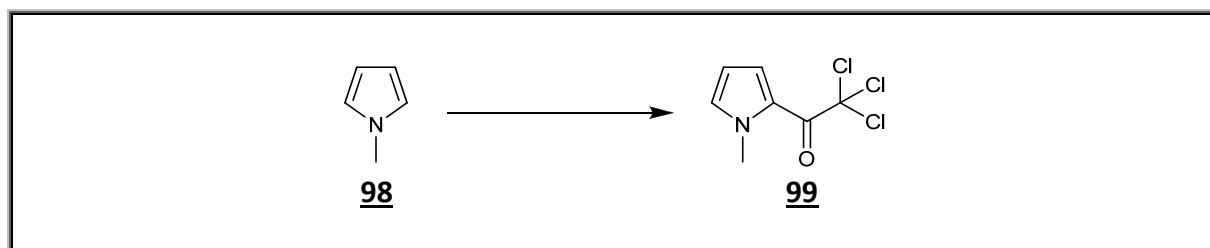
#### 10.5.14 4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-sulfonsäure (**93**)



5.00 g (49 mmol) **92** werden in einer Lösung von 36 mg (0.075 mmol)  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  in 30 ml Wasser suspendiert und dann auf 0 °C gekühlt. Hierzu tropft man innerhalb 4 h 34.00 ml (148 mmol, 3.02 eq) einer 15%igen  $H_2O_2$ -Lösung, wobei die Temperatur 5 °C nicht übersteigen soll. Nach beendeter Zugabe lässt man die Reaktionslösung für 12 h bei 0 °C kristallisieren. Der Feststoff **93** wird filtriert, mit  $iPrOH$  nachgewaschen und im Vakuum getrocknet.

**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:**

<b>Ausbeute:</b>	3.12 g (42%)	Theorie: 7.35 g
<b>DC:</b>	EtOAc/EtOH/H <sub>2</sub> O/HOAc = 11:4:4:1	R <sub>f</sub> = 0.37
<b>Schmelzpunkt:</b>	141-142 °C (Zersetzung)	Lit. <sup>[110]</sup> : 142 °C (Zersetzung)
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10.11 (br, 2H, 2x NH*), 3.86 (s, 4H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )	
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(δ[ppm], 60 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 169.06, 44.83	
<b>IR (KBr):</b>	3212 (s), 2942 (m), 2630 (w), 1694 (m), 1674 (m), 1614 (s), 1580 (m), 1464 (w), 1386 (m), 1283 (s), 1251 (s), 1157 (m), 1070 (s), 1061 (s), 1043 (m), 1018 (m), 963 (m), 835 (w), 729 (m), 638 (s)	
<b>Masse:</b>	ESI– (berechnet für C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S–H <sup>+</sup> ): berechnet: 149.0 gefunden: 148.5	
<b>Elementaranalyse:</b>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	
	berechnet:	C: 24.00      H: 4.03      N: 18.66
	gefunden:	C: 24.20      H: 4.11      N: 18.83

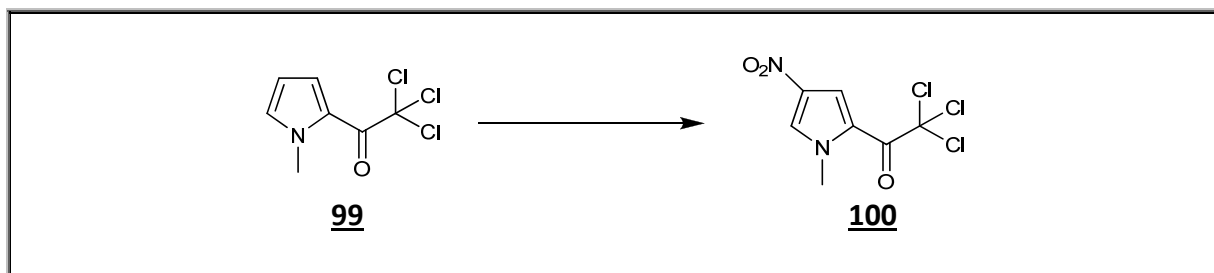
10.5.15 2-Trichloracetyl-1-methylpyrrol (**99**)

28.06 ml (250 mmol) TCEC werden bei RT in 100 ml DCM vorgelegt. Zu dieser Lösung tropft man eine zweite aus 22.28 ml (250 mmol, 1 eq) **98** in 100 ml DCM über etwa 3 h unter konstantem Rühren hinzu und rührt im Anschluss noch über Nacht. Das Lösungsmittel wird evaporiert und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (300 g Kieselgel, Laufmittel: Hex/DCM = 7:3). Man erhält **99** als blass gelben Feststoff.

ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

<b>Ausbeute:</b>	42.60 g (75 %)	Theorie: 56.62 g
<b>DC:</b>	Hex/EtOAc = 5:2	R <sub>f</sub> = 0.55
<b>Schmelzpunkt:</b>	64 °C	Lit. <sup>[136]</sup> : 64-65 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(δ[ppm], 250 MHz, CDCl <sub>3</sub> -d <sub>1</sub> ): 7.49 (dd, 1H, <i>J</i> = 1.6 / 4.4, Py-C <sup>3</sup> -H), 6.97 (m, 1H, Py-C <sup>5</sup> -H), 6.21 (dd, 1H, <i>J</i> = 2.4 / 4.4, Py-C <sup>4</sup> -H), 3.96 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> )	
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(δ[ppm], 60 MHz, CDCl <sub>3</sub> -d <sub>1</sub> ): 172.75, 133.58, 123.93, 121.72, 108.82, 96.26, 38.44	
<b>IR (KBr):</b>	3120 (w), 2953 (w), 1664 (s), 1521 (m), 1482 (w), 1457 (m), 1426 (m), 1402 (s), 1360 (m), 1331 (m), 1244 (m), 1205 (m), 1100 (m), 1067 (m), 1042 (m), 980 (m), 893 (w), 881 (m), 844 (s), 807 (s), 741 (s), 685 (s), 598 (s)	
<b>Elementaranalyse:</b>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>3</sub> NO	
	berechnet:	C: 37.12      H: 2.67      N: 6.18
	gefunden:	C: 37.18      H: 2.70      N: 6.03

### 10.5.16 4-Nitro-2-trichloracetyl-1-methylpyrrol (**100**)



16.99 g (75 mmol) **99** werden in 150 ml Ac<sub>2</sub>O gelöst und auf etwa -50 °C gekühlt. Zu dieser Lösung tropft man so langsam 6.30 ml (150 mmol, 2 eq) 100%ige HNO<sub>3</sub> zu, dass eine Temperatur von -40 °C nicht überschritten wird. Nach beendeter Zugabe rührt man noch 30 min bei -45 °C, lässt dann auf RT erwärmen und rührt noch weitere 4 h. Die Reaktionslösung wird dann auf ca. 50 ml eingeeengt und dann sehr schnell auf -50 °C abgekühlt. Hierbei fällt dann ein beigefarbener Feststoff aus. Die Suspension wird mit 100 ml <sup>i</sup>PrOH versetzt und noch 30 min bei ca. -40 °C gerührt. Man filtriert den Feststoff ab und wäscht mit kaltem <sup>i</sup>PrOH nach, bis das Filtrat farblos wird. Nach Trocknen in Vakuum erhält man **100** als weißen bis blass beigefarbenen, analysenreinen Feststoff.

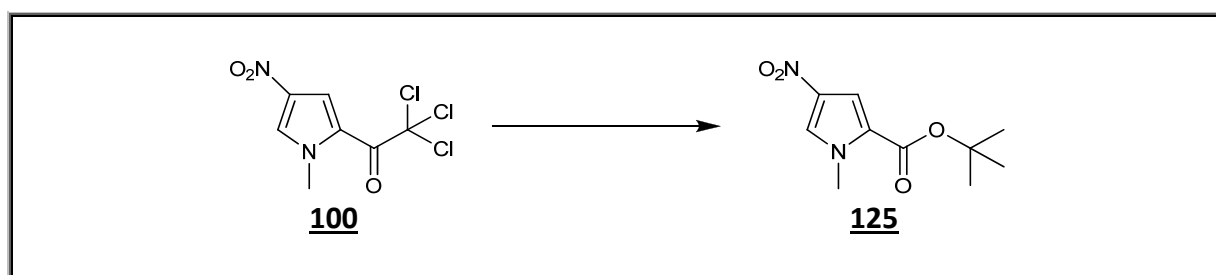
#### ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

<b>Ausbeute:</b>	14.21 g (70 %)	Theorie: 20.36 g
<b>DC:</b>	Hex/EtOAc = 1:1	R <sub>f</sub> = 0.72
<b>Schmelzpunkt:</b>	135-136 °C	Lit. <sup>[137]</sup> : 135-140 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(δ[ppm], 250 MHz, CDCl <sub>3</sub> -d <sub>1</sub> ): 7.93 (d, 1H, <i>J</i> = 1.8, Py-C <sup>3</sup> -H), 7.76 (m, 1H, Py-C <sup>5</sup> -H), 4.05 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> )	
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(δ[ppm], 60 MHz, CDCl <sub>3</sub> -d <sub>1</sub> ): 173.62, 135.29, 130.22, 121.36, 117.47, 94.80, 39.71	
<b>IR (KBr):</b>	3133 (w), 1694 (s), 1535 (s), 1516 (s), 1495 (s), 1423 (m), 1405 (s), 1320 (s), 1224 (m), 1182 (m), 1112 (s), 1076 (m), 998 (m), 986 (m), 860 (s), 840 (m), 814 (s), 800 (s), 750 (s), 715 (m), 684 (m), 609 (m), 594 (m), 581 (m)	

**Masse:** ESI– (berechnet für  $\text{C}_7\text{H}_5\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{--H}^+$ ):  
 berechnet: 268.9  
 gefunden: 168.8 (Haloform-Reaktion mit  $\text{NH}_3$ )

<b>Elementaranalyse:</b>	$C_7H_5Cl_3N_2O_3$		
berechnet:	C: 30.97	H: 1.86	N: 10.32
gefunden:	C: 30.89	H: 1.96	N: 10.46

#### 10.5.17 4-Nitro-1-methylpyrrol-2-carbonsäure-tert-butylester (125)



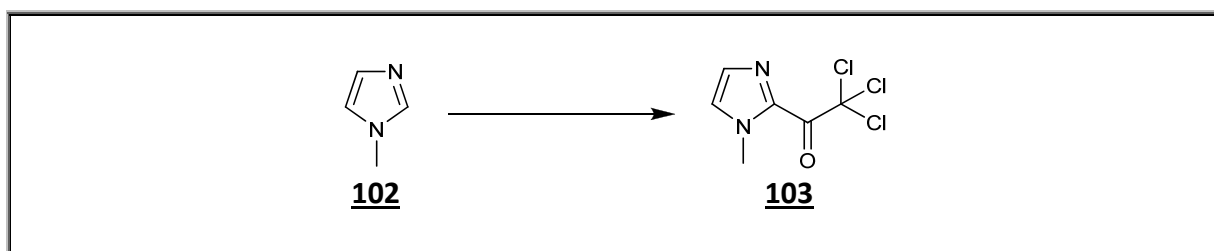
5.43 g **100** (20.00 mmol) werden in 60 ml <sup>t</sup>BuOH suspendiert. Es erfolgt die portionsweise Zugabe von 2.74 g NaO<sup>t</sup>Bu (28.00 mmol, 1.4 eq.) über einen Zeitraum von 15 min. Die gelbe Suspension wird dann 5 h zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktion wird mit 60 ml Wasser gequencht und die Lösung in einen Scheidetrichter überführt. Es werden noch 140 ml Wasser hinzugefügt und die klare orangefarbene Phase dreimal mit je 150 ml CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel evaporiert. Das zurückbleibende gelb-orangene Öl wird im Vakuum getrocknet. Man erhält **125** als gelben Feststoff.

## ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

<b>Ausbeute:</b>	4.13 g (91 %)	Theorie: 4.53 g
<b>DC:</b>	Hex/EtOAc = 2:1	R <sub>f</sub> = 0.72
<b>Schmelzpunkt:</b>	77-78 °C	Lit. <sup>[138]</sup> : 77.5-78.5 °C

<b><math>^1\text{H-NMR}</math>:</b>	( $\delta$ [ppm], 250 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ): 7.54 (d, 1H, $J = 2.0$ , Py- $H$ ), 7.32 (d, 1H, $J = 2.0$ , Py- $H$ ), 3.96 (s, 3H, N- $\text{CH}_3$ ), 1.56 (s, 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ )
<b><math>^{13}\text{C-NMR}</math>:</b>	( $\delta$ [ppm], 75 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ): 158.62, 133.84, 129.01, 123.94, 111.28, 81.55, 37.41, 27.68
<b>IR (KBr):</b>	3144 (w), 3008 (w), 2976 (w), 1717 (s), 1538 (m), 1515 (s), 1460 (m), 1428 (m), 1405 (m), 1375 (m), 1314 (s), 1256 (s), 1160 (s), 1112 (s), 1085 (m), 1070 (m), 852 (s), 811 (s), 762 (m), 750 (s), 708 (m), 615 (w), 590 (m)
<b>Masse:</b>	ESI+ (berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4 + \text{H}^+$ ): berechnet: 227.1 gefunden: 243.9 (39.31, $\text{M} + \text{NH}_4^+$ ) 226.8 (29.87, $\text{M} + \text{H}^+$ ) 170.8 (100.00, $\text{M} + \text{H}^+$ , $-\text{tBu}$ )
<b>Elementaranalyse:</b>	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$ berechnet: C: 53.09                      H: 6.24                      N: 12.38 gefunden: C: 53.15                      H: 6.24                      N: 12.51

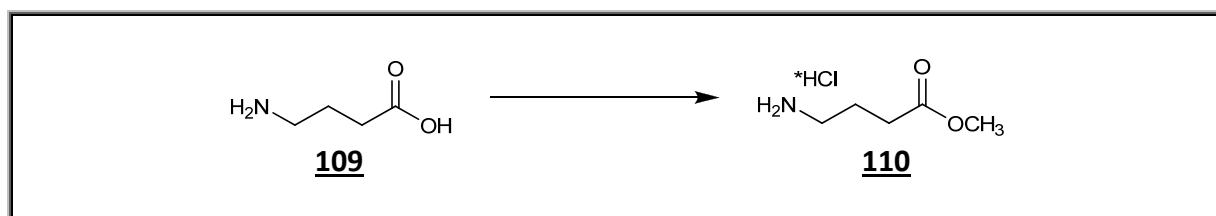
### 10.5.18 2-Trichloracetyl-1-methylimidazol (**103**)



Zu einer Lösung von 28.06 ml (250 mmol, 1 eq) TCEC in 150 ml abs. DCM tropft man 19.93 ml (250 mmol) **102** in 150 ml abs. DCM bei RT langsam über etwa 3 h zu. Nach weiteren 6 h rühren bei RT kühlt man die entstandene Suspension auf 0 °C und gibt tropfenweise 34.65 ml (250 mmol, 1 eq) TEA über etwa 2 h zu. Das Lösungsmittel wird evaporiert und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (400 g Kieselgel, Laufmittel: Hex/EtOAc = 3:1). Nach Evaporation des Eluenten erhält man **103** als annähernd farblosen, analysenreinen Feststoff.

**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:**

<b>Ausbeute:</b>	40.87 g (72 %)	Theorie: 56.87 g
<b>DC:</b>	Hex/EtOAc = 1:1	R <sub>f</sub> = 0.50
<b>Schmelzpunkt:</b>	79-80 °C	Lit. <sup>[137]</sup> : 79-80 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(δ[ppm], 250 MHz, CDCl <sub>3</sub> -d <sub>1</sub> ): 7.32 (d, 1H, <i>J</i> = 0.8, Im-C <sup>4</sup> H), 7.15 (m, 1H, Im-C <sup>5</sup> H), 4.04 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> )	
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(δ[ppm], 60 MHz, CDCl <sub>3</sub> -d <sub>1</sub> ): 172.09, 136.01, 130.44, 128.51, 94.74, 37.04	
<b>IR (KBr):</b>	3138 (m), 3113 (m), 2959 (w), 1781 (w), 1758 (w), 1685 (s), 1504 (w), 1478 (m), 1442 (m), 1386 (s), 1293 (s), 1239 (m), 1222 (m), 1169 (s), 1076 (m), 1054 (m), 1013 (s), 916 (s), 894 (m), 850 (s), 820 (s), 791 (m), 743 (s), 696 (s), 650 (s), 608 (m)	
<b>Elementaranalyse:</b>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O	
	berechnet:	C: 31.68      H: 2.22      N: 12.31
	gefunden:	C: 31.77      H: 2.28      N: 12.52

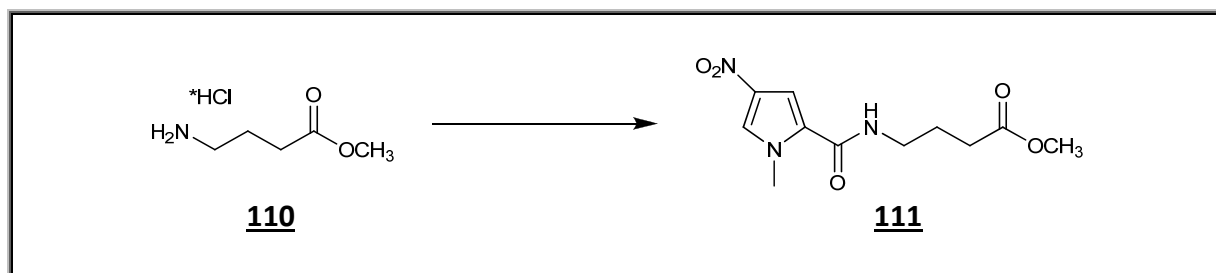
**10.5.19 γ-Aminobutansäuremethylester Hydrochlorid (110)**

6.91 g (67 mmol) 109 werden in 100 ml MeOH suspendiert und auf 0 °C abgekühlt. Hierzu tropft man langsam 14.66 ml (201 mmol, 3 eq) SOCl<sub>2</sub> und rührt nach Zugabe noch 120 min bei RT, wobei sich der Feststoff komplett auflöst. Nach Evaporation des Lösungsmittels und Trocknen um Vakuum erhält man 110 als weißen, analysenreinen Feststoff.



**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:**

<b>Ausbeute:</b>	10.28 g (99%)	Theorie: 10.29 g
<b>DC:</b>	EtOAc/MeOH 1:1 + NEt <sub>3</sub>	R <sub>f</sub> = 0.38
<b>Schmelzpunkt:</b>	121 °C	Lit. <sup>[139]</sup> : 121.5-122.5 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 8.18 (br, 3H, NH <sub>3</sub> *), 3.59 (s, 3H, COOCH <sub>3</sub> ), 2.77 (sx, 2H, J = 6.8, C <sup>4</sup> H <sub>2</sub> , D <sub>2</sub> O: sx→t), 2.44 (t, 2H, J = 7.5, C <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ), 1.81 (qn, 2H, J = 7.5, C <sup>3</sup> H <sub>2</sub> )	
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(δ[ppm], 60 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 172.60, 51.35, 37.92, 30.18, 22.28	
<b>IR (KBr):</b>	2956 (s), 2661 (m), 2490 (w), 1955 (w), 1734 (s), 1598 (m), 1515 (m), 1467 (m), 1429 (m), 1386 (m), 1300 (m), 1218 (s), 1154 (m), 1068 (m), 1032 (w), 970 (m), 882 (m), 758 (m), 701 (m), 587 (w)	
<b>Masse:</b>	ESI+ (berechnet für C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> +H <sup>+</sup> ): berechnet: 118.1 gefunden: 117.7	
<b>Elementaranalyse:</b>	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> ClNO <sub>2</sub> berechnet: C: 39.10 H: 7.87 N: 9.12 gefunden: C: 39.13 H: 7.98 N: 9.03	

10.5.20 O<sub>2</sub>N-Py-γ-OMe (**111**)

4.00 g (26.04 mmol) **110** werden in 35 ml DCM suspendiert und mit 6.69 ml (39.06 mmol, 1.5 eq) DIEA in Lösung gebracht. Man gibt dann 7.78 g (28.64 mmol, 1.1 eq) **100** hinzu und rührt die Reaktionsmischung für 16 h bei RT. Nach dieser Zeit wird das Lösungsmittel evaporiert und der Rückstand an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (300 g Kieselgel, Laufmittel: Hex/EtOAc = 1:2). Man erhält **111** als weißen Feststoff.

ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

**Ausbeute:** 6.85 g (98%) Theorie: 7.01 g

**DC:** Hex/EtOAc = 1:1  $R_f$  = 0.26

**Schmelzpunkt:** 120-121 °C Lit.: unbekannt

**<sup>1</sup>H-NMR:** (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
 8.39 (t, 1H,  $J$  = 5.4, γ-NH\*), 8.11 (d, 1H,  $J$  = 1.8, Py-H), 7.42 (d, 1H,  $J$  = 2.0, Py-H), 3.90 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.58 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.22 (q, 2H,  $J$  = 6.7, C<sup>4</sup>H<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O: q→t), 2.36 (t, 2H,  $J$  = 7.4, C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>), 1.75 (qn, 2H,  $J$  = 7.1, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR:** (δ[ppm], 60 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
 172.99, 159.73, 133.63, 127.70, 126.31, 107.16, 51.15, 37.82, 37.24, 30.63, 24.25

**IR (KBr):** 3392 (m), 3150 (w), 3130 (m), 2945 (w), 2884 (w), 1734 (s), 1665 (s), 1545 (m), 1522 (s), 1507 (s), 1485 (m), 1465 (m), 1416 (s), 1352 (m), 1317 (s), 1282 (s), 1199 (m), 1175 (m), 1134 (m), 1101 (m), 1052 (w), 980 (m), 893 (w), 850 (m), 810 (m), 746 (m), 709 (w), 588 (w)

**Masse:** ESI+ (berechnet für  $C_{11}H_{15}N_3O_5 + H^+$ ):

berechnet: 270.1

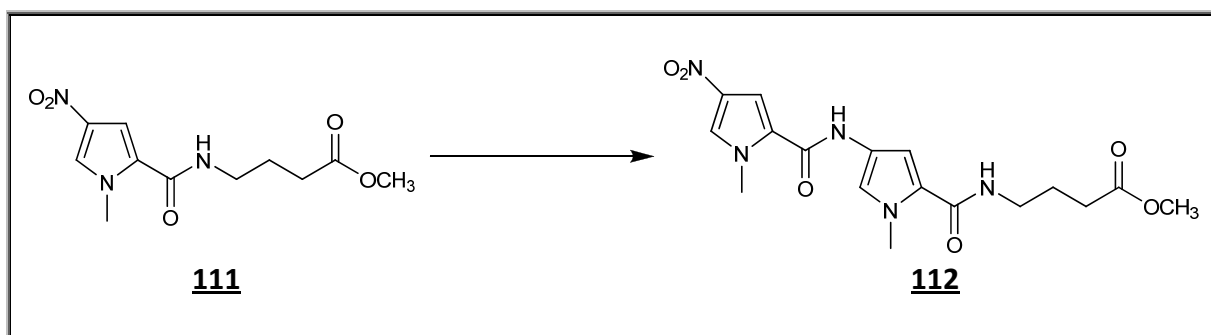
gefunden: 270.0

**Elementaranalyse:**  $C_{11}H_{15}N_3O_5$

berechnet: C: 49.07                      H: 5.62                      N: 15.61

gefunden: C: 49.22                      H: 5.73                      N: 15.60

### 10.5.21 $O_2N$ -Py-Py- $\gamma$ -OMe (**112**)



2.00 g (7.4 mmol) **111** werden zu einer Suspension von 0.3 g Pd/C (10%ig) in 30 ml abs. MeOH gegeben und bei 40 bar  $H_2$ -Druck und 55 °C für 2 h gerührt. Die Suspension wird auf RT abgekühlt, in einer Schlenkfritte unter Ar über Celite filtriert und das Lösungsmittel evaporiert. Man trocknet das Öl kurz im Vakuum, nimmt das Produkt mit 10 ml DCM auf und tropft es zu 2.40 g (8.8 mmol, 1.2 eq) **100**, welches in 30 ml DCM vorgelegt wird. Dann gibt man portionsweise 0.297 g (7.4 mmol, 1 eq) NaH (60 %ige Dispersion in Mineralöl) über einen Zeitraum von 30 min zu, und danach noch 1.91 ml (11.14 mmol, 1.5 eq) DIEA. Diese Reaktionsmischung wird für 16 h bei RT gerührt, wobei ein gelber Feststoff ausfällt. Zur Aufarbeitung gibt man vorsichtig 20 ml  $H_2O$  hinzu, durchmischt die Suspension intensiv und filtriert. Der Rückstand wird nacheinander mit  $H_2O$ , DCM und MeOH gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält **112** als gelbes, analysenreines Pulver.

#### ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

**Ausbeute:** 2.11 g (73%)

Theorie: 2.88 g

**DC:** Hex/EtOAc = 1:2

$R_f$  = 0.18

**Schmelzpunkt:** 202-203 °C

Lit.: unbekannt

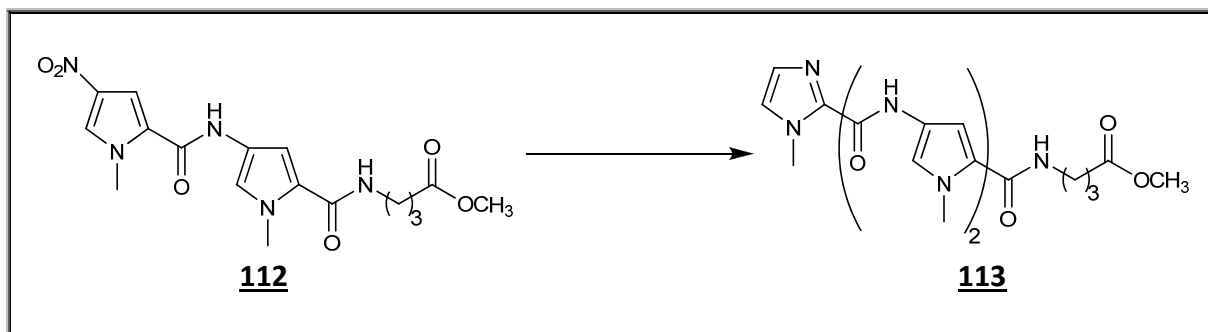
**<sup>1</sup>H-NMR:** (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 10.23 (s, 1H, Py-CONH-Py\*), 8.17 (d, 1H, *J* = 1.7, Py-*H*), 8.08 (t, 1H, *J* = 5.6, γ-NH\*), 7.57 (d, 1H, *J* = 2.0, Py-*H*), 7.20 (d, 1H, *J* = 1.7, Py-*H*), 6.85 (d, 1H, *J* = 1.8, Py-*H*), 3.95 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.58 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.18 (q, 2H, *J* = 6.6, C<sup>4</sup>H<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O: q→t), 2.34 (t, 2H, *J* = 7.4, C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>), 1.74 (qn, 2H, *J* = 7.1, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR:** (δ[ppm], 60 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 173.08, 161.08, 156.74, 133.68, 128.11, 126.21, 123.09, 121.23, 117.88, 107.45, 103.92, 51.16, 37.64, 37.38, 35.92, 30.72, 24.57

**IR (KBr):** 3423 (m), 3303 (w), 3134 (w), 3095 (w), 2952 (w), 1724 (m), 1670 (m), 1646 (m), 1590 (m), 1566 (m), 1540 (m), 1517 (m), 1491 (m), 1437 (m), 1416 (m), 1308 (s), 1250 (m), 1203 (m), 1176 (m), 1112 (w), 1095 (w), 996 (w), 886 (w), 814 (w), 780 (w), 741 (w), 643 (w), 593 (w)

**Masse:** ESI+ (berechnet für  $C_{17}H_{21}N_5O_6 + H^+$ ):  
 berechnet: 392.2  
 gefunden: 391.8

<b>Elementaranalyse:</b>	$C_{17}H_{21}N_5O_6$		
berechnet:	C: 52.17	H: 5.41	N: 17.89
gefunden:	C: 52.28	H: 5.45	N: 17.76

10.5.22 Im-Py-Py- $\gamma$ -OMe (**113**)

2.00 g (5.11 mmol) **112** wird in 30 ml abs. EtOAc suspendiert und zu einer Mischung von 0.30 g Pd/C (10%ig) in 20 ml abs. EtOAc gegeben. Diese Mischung wird bei 40 bar H<sub>2</sub>-Druck und 60 °C für 3 h gerührt. Die Suspension wird auf RT abgekühlt, in einer Schlenkfritte unter Ar über Celite filtriert und das Lösungsmittel evaporiert. Man trocknet das Öl kurz im Vakuum, nimmt das Produkt mit 10 ml DCM auf, und tropft es zu 1.39 g (6.13 mmol, 1.2 eq) **103**, welches in 30 ml DCM vorgelegt wird. Nach Zugabe von 1.31 ml (7.67 mmol, 1.5 eq) DIEA rührt man die Reaktionsmischung für 16 h bei RT. Das Lösungsmittel wird evaporiert, der Rückstand an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (100 g Kieselgel, Laufmittel: Hex/EtOAc/MeOH = 2:9:1). Der noch leicht gelbe Feststoff wird aus EtOH umkristallisiert. Man erhält **113** als weißen Feststoff.

**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:**

<b>Ausbeute:</b>	1.98 g (83 %)	Theorie: 2.40 g
<b>DC:</b>	EtOAc/MeOH = 9:1	R <sub>f</sub> = 0.36
<b>Schmelzpunkt:</b>	128-129 °C	Lit.: unbekannt

**<sup>1</sup>H-NMR:** (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
 10.44 (s, 1H, Py-CONH-Py\*), 9.90 (s, 1H, Im-CONH-Py\*), 8.03 (t, 1H, J = 5.8,  $\gamma$ -NH\*), 7.39 (d, 1H, J = 0.8, Im-H), 7.29 (d, 1H, J = 1.7, Py-H), 7.18 (d, 1H, J = 1.7, Py-H), 7.16 (d, 1H, J = 1.8, Py-H), 7.04 (d, 1H, J = 0.8, Im-H), 6.88 (d, 1H, J = 1.8, Py-H), 4.00 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.59 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.18 (q, 2H, J = 6.6, C<sup>4</sup>H<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O: q→t), 2.34 (t, 2H, J = 7.4, C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>), 1.74 (qn, 2H, J = 7.1, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>)

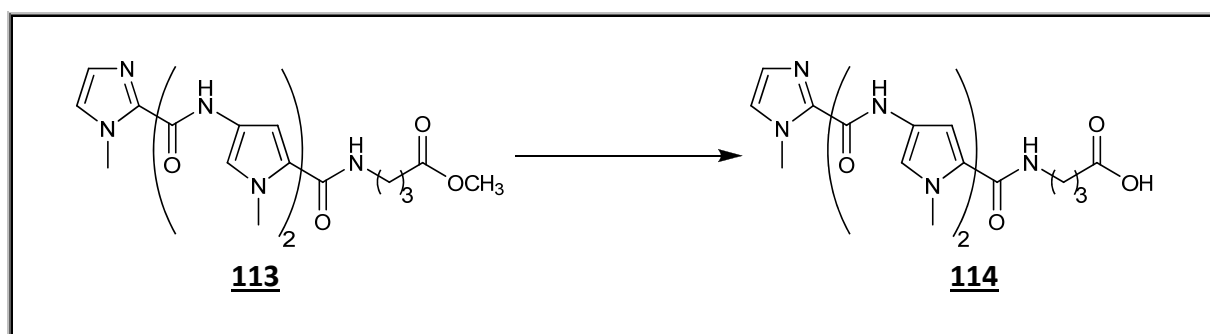
**$^{13}\text{C}$ -NMR:** ( $\delta$ [ppm], 60 MHz, DMSO- $d_6$ ):  
 173.08, 161.22, 158.32, 156.01, 138.70, 126.89, 126.24, 122.94, 122.80,  
 121.99, 121.34, 118.51, 117.72, 104.82, 104.15, 51.15, 37.62, 36.01,  
 35.82, 35.01, 30.72, 24.59

**IR (KBr):** 3409 (m), 3272 (m), 3130 (w), 3115 (w), 2951 (w), 1717 (s), 1672 (m),  
 1634 (s), 1580 (s), 1562 (m), 1544 (s), 1521 (s), 1469 (m), 1450 (m),  
 1432 (s), 1405 (m), 1381 (m), 1368 (m), 1274 (m), 1256 (m), 1203 (m),  
 1180 (m), 1158 (w), 1146 (m), 1125 (m), 1087 (w), 1066 (m), 1010 (w),  
 979 (w), 937 (w), 883 (m), 787 (m), 750 (w), 737 (w), 700 (w), 660 (w),  
 641 (m), 621 (w), 609 (w)

**Masse:** ESI+ (berechnet für  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_5 + \text{H}^+$ ):  
 berechnet: 470.2  
 gefunden: 470.0

**Elementaranalyse:**  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_5$   
 berechnet: C: 56.28                      H: 5.80                      N: 20.88  
 gefunden: C: 56.02                      H: 6.00                      N: 20.96

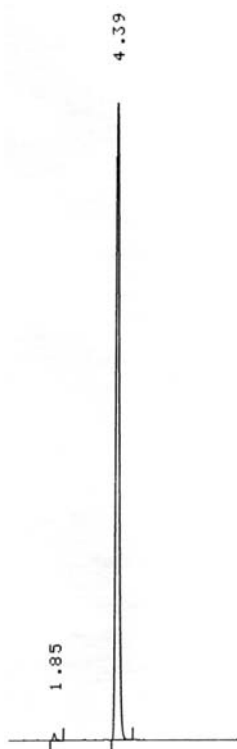
### 10.5.23 Im-Py-Py- $\gamma$ -OH (**114**)



1.00 g (2.1 mmol) **113** werden in 40 ml einer 3:1-Mischung von MeOH und  $\text{H}_2\text{O}$  suspendiert und auf 0 °C abgekühlt. Man fügt dann 0.44 g (10.5 mmol, 5 eq)  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  hinzu und rührt für 16 h, wobei die Reaktionsmischung langsam bis auf RT aufwärmt. Nach dieser Zeit wird die nun klare, blass gelbe Lösung an Kieselgel adsorbiert und via Säulenchromatographie aufgereinigt (100 g Kieselgel; Laufmittel: DCM/MeOH = 5:1). Man erhält **114** als weißen Feststoff.

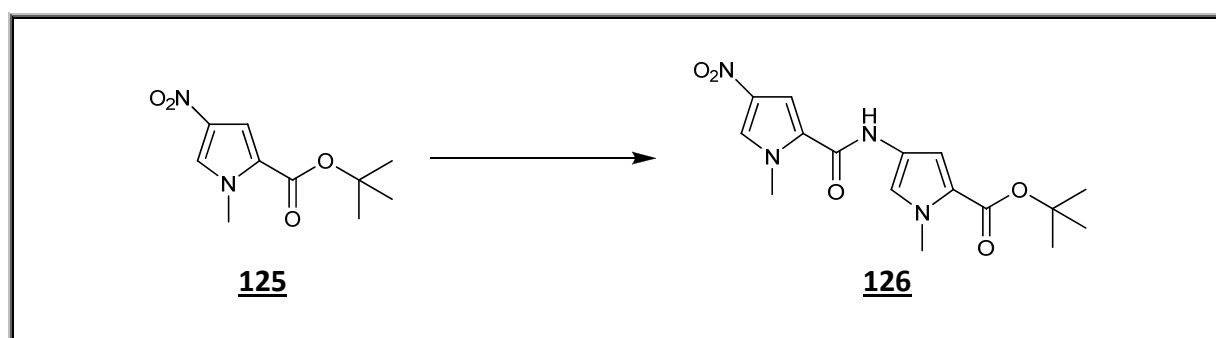
**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:**

<b>Ausbeute:</b>	0.95 g (98%)	Theorie: 0.97 g
<b>DC:</b>	DCM/MeOH = 5:1	R <sub>f</sub> = 0.24
<b>Schmelzpunkt:</b>	174-175 °C	Lit.: unbekannt
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 12.07 (br, 1H, COOH), 10.44 (s, 1H, Py-CONH-Py*), 9.90 (s, 1H, Im-CONH-Py*), 8.04 (t, 1H, J = 5.9, γ-NH*), 7.39 (d, 1H, J = 0.7, Im-H), 7.28 (d, 1H, J = 1.7, Py-H), 7.18 (d, 1H, J = 1.7, Py-H), 7.15 (d, 1H, J = 1.8, Py-H), 7.04 (d, 1H, J = 0.9, Im-H), 6.87 (d, 1H, J = 1.7, Py-H), 4.00 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), 3.84 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), 3.80 (s, 3H, N-CH <sub>3</sub> ), 3.18 (q, 2H, J = 5.5, C <sup>4</sup> H <sub>2</sub> ), D <sub>2</sub> O: q→t), 2.25 (t, 2H, J = 7.0, C <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ), 1.71 (qn, 2H, J = 7.0, C <sup>3</sup> H <sub>2</sub> )	
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(δ[ppm], 100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 175.99, 161.23, 158.38, 156.05, 138.73, 126.94, 126.27, 123.01, 122.98, 122.00, 121.34, 118.56, 117.72, 104.88, 104.19, 38.36, 36.04, 35.84, 35.03, 32.82, 25.10,	
<b>IR (KBr):</b>	3352 (s), 3133 (m), 2928 (m), 2869 (w), 1648 (s), 1591 (s), 1527 (s), 1474 (s), 1432 (s), 1399 (s), 1362 (s), 1346 (m), 1262 (s), 1199 (s), 1165 (m), 1128 (s), 1098 (m), 1056 (m), 1033 (w), 1005 (w), 962 (w), 894 (w), 808 (m), 782 (m), 766 (m), 704 (m), 676 (m), 635 (m), 624 (m), 609 (m)	
<b>Masse:</b>	ESI– (berechnet für C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub> –H <sup>+</sup> ): berechnet: 454.2 gefunden: 454.3	
<b>Elementaranalyse:</b>	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub> berechnet: C: 55.38                      H: 5.53                      N: 21.53 Eine korrekte Elementaranalyse konnte auch nach HPLC-Aufreinigung nicht erhalten werden (siehe <i>Abbildung 10-11</i> ).	



**Abbildung 10-11:** ELSD-Spur einer isokratischen HPLC-Analytik von **114** (0.1% TFA in H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN = 77:23). Die elektronischer Integration zeigt eine Reinheit >99%.

#### 10.5.24 O<sub>2</sub>N-Py-Py-O<sup>t</sup>Bu (**126**)



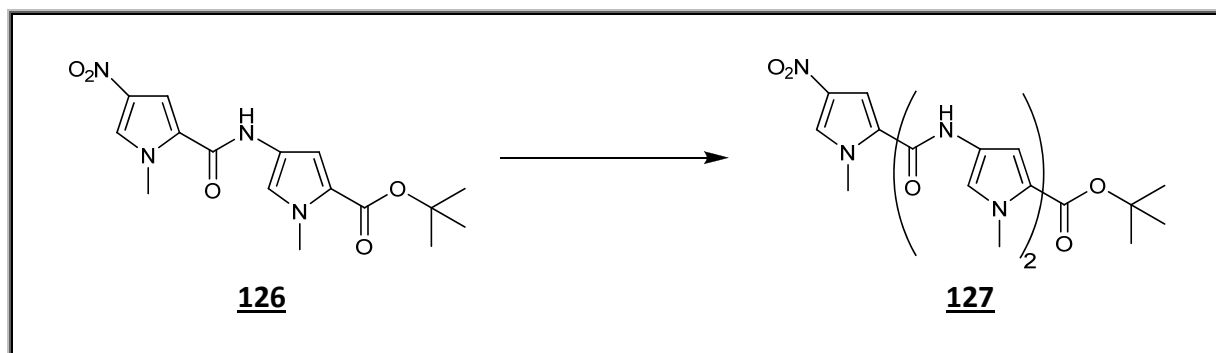
4.00 g (17.68 mmol) **125** werden zu einer Suspension von 0.4 g Pd/C (10%ig) in 50 ml abs. EtOAc gegeben und bei 40 bar H<sub>2</sub>-Druck und 55 °C für 3 h gerührt. Die Suspension wird auf RT abgekühlt, in einer Schlenkfritte unter Ar über Celite filtriert und das Lösungsmittel evaporiert. Man trocknet das Öl kurz im Vakuum, nimmt das Produkt mit 10 ml DCM auf und tropft es zu 5.28 g (19.45 mmol, 1.1 eq) **100**, welches in 40 ml DCM vorgelegt wird. Danach gibt man noch 4.54 ml (26.52 mmol, 1.5 eq) DIEA hinzu. Diese Reaktionsmischung wird für 16 h bei RT gerührt, wobei ein gelber Feststoff ausfällt. Das Produkt wird abfiltriert, mit DCM



nachgewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält **126** als gelbes, analysenreines Pulver.

**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:**

<b>Ausbeute:</b>	4.56 g (74%)	Theorie: 6.16 g	
<b>DC:</b>	Hex/EtOAc = 1:1	R <sub>f</sub> = 0.44	
<b>Schmelzpunkt:</b>	218-219 °C	Lit.: unbekannt	
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10.20 (s, 1H, NH*), 8.17 (d, 1H, J = 1.6, Py-H), 7.56 (d, 1H, J = 2.0, Py-H), 7.38 (d, 1H, J = 2.0, Py-H), 6.82 (d, 1H, J = 2.0, Py-H), 3.95 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 3.81 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 1.51 (s, 9H, OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )		
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(δ[ppm], 60 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 159.70, 156.72, 133.72, 128.11, 125.97, 121.74, 120.28, 120.10, 108.21, 107.45, 79.68, 37.31, 36.14, 27.91		
<b>IR (KBr):</b>	3403 (m), 3138 (w), 2978 (w), 1701 (s), 1667 (s), 1574 (m), 1558 (m), 1532 (m), 1502 (s), 1480 (m), 1468 (m), 1438 (m), 1416 (m), 1406 (s), 1387 (m), 1369 (m), 1345 (w), 1306 (s), 1274 (m), 1245 (m), 1205 (w), 1169 (m), 1102 (s), 1060 (m), 988 (w), 888 (w), 844 (w), 832 (w), 813 (w), 790 (m), 750 (m), 653 (w), 633 (w), 590 (w)		
<b>Masse:</b>	ESI+ (berechnet für C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> +H <sup>+</sup> ): berechnet: 349.1 gefunden: 349.0		
<b>Elementaranalyse:</b>	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> berechnet: C: 55.17 H: 5.79 N: 16.08 gefunden: C: 55.33 H: 5.81 N: 16.18		

**10.5.25 O<sub>2</sub>N-Py-Py-Py-O<sup>t</sup>Bu (127)**

2.00 g (5.74 mmol) **126** werden zu einer Suspension von 0.2 g Pd/C (10%ig) in 50 ml abs. EtOAc gegeben und bei 40 bar H<sub>2</sub>-Druck und 55 °C für 3 h gerührt. Die Suspension wird auf RT abgekühlt, in einer Schlenkfritte unter Ar über Celite filtriert und das Lösungsmittel evaporiert. Man trocknet das Öl kurz im Vakuum, nimmt das Zwischenprodukt mit 10 ml DCM auf und tropft es zu 1.72 g (6.32 mmol, 1.1 eq) **100**, welches in 30 ml DCM vorgelegt wird. Danach gibt man noch 1.47 ml (8.61 mmol, 1.5 eq) DIEA hinzu. Die Reaktionsmischung wird für 16 h bei RT gerührt, dann an Kieselgel adsorbiert und per Chromatographie aufgereinigt (150 g Kieselgel, Laufmittel: Hex/EtOAc = 1:1). Man erhält **127** als gelben Feststoff.

**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:**

**Ausbeute:** 2.15 g (79%) Theorie: 2.70 g

**DC:** Hex/EtOAc = 1:1 R<sub>f</sub> = 0.37

**Schmelzpunkt:** 179-180 °C Lit.: unbekannt

**<sup>1</sup>H-NMR:** (δ[ppm], 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
 10.29 (s, 1H, NH\*), 9.93 (s, 1H, NH\*), 8.19 (d, 1H, *J* = 1.7, Py-*H*), 7.59 (d, 1H, *J* = 2.0, Py-*H*), 7.39 (d, 1H, *J* = 1.9, Py-*H*), 7.25 (d, 1H, *J* = 1.8, Py-*H*), 7.07 (d, 1H, *J* = 1.8, Py-*H*), 6.85 (d, 1H, *J* = 2.0, Py-*H*), 3.96 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.86 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.51 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

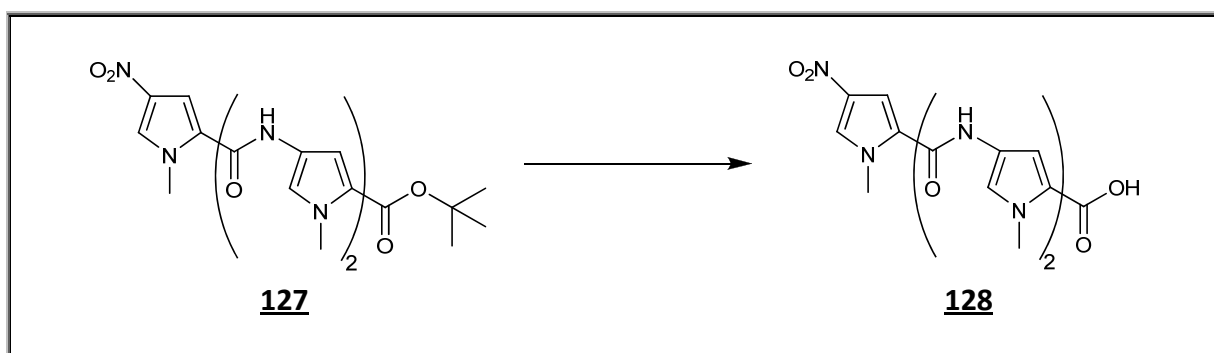
**<sup>13</sup>C-NMR:** (δ[ppm], 75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
 159.82, 158.17, 156.80, 133.68, 128.05, 126.19, 122.70, 122.47, 121.36, 120.05, 119.96, 118.59, 108.29, 107.44, 104.45, 79.52, 37.31, 36.08, 36.05, 27.94

**IR (KBr):** 3464 (w), 3359 (w), 3134 (w), 2963 (w), 1699 (s), 1660 (s), 1595 (s), 1576 (m), 1544 (s), 1532 (s), 1499 (m), 1474 (m), 1434 (s), 1420 (s), 1406 (s), 1366 (m), 1309 (s), 1278 (m), 1253 (s), 1205 (w), 1167 (m), 1115 (s), 1060 (m), 988 (w), 887 (w), 849 (w), 815 (w), 784 (w), 749 (w), 712 (w), 633 (w), 586 (w)

**Masse:** ESI+ (berechnet für  $C_{22}H_{26}N_6O_6 + H^+$ ):  
 berechnet: 471.2  
 gefunden: 471.1

<b>Elementaranalyse:</b>	$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_6 \times 1 \text{ eq DMF}^{[\text{XXI}]}$		
berechnet:	C: 55.24	H: 6.12	N: 18.04
gefunden:	C: 55.07	H: 6.12	N: 18.08

### 10.5.26 O<sub>2</sub>N-Py-Py-Py-OH (**128**)



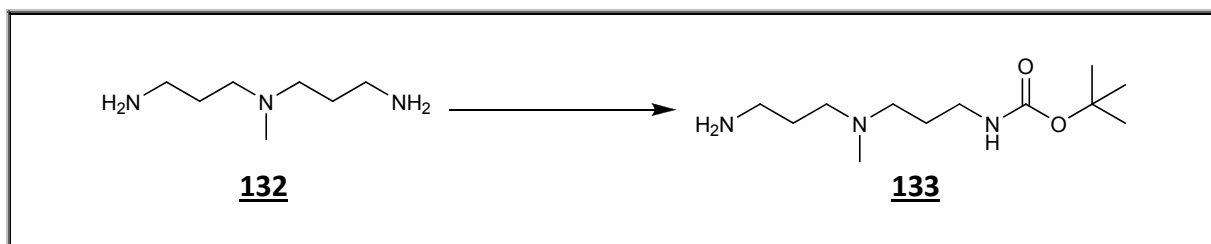
2.00 g (4.25 mmol) **127** werden in 40 ml abs. DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Hierzu tropft man langsam eine Lösung aus 0.93 ml (8.50 mmol, 2 eq) TiCl<sub>4</sub> in 15 ml abs. DCM, wobei die Temperatur unter 5 °C gehalten wird. Nach beendeter Zugabe rührt man noch weitere 30 min bei 0 °C, erwärmt dann auf RT und tropft langsam 100 ml 1n HCl-Lösung hinzu, wobei die Lösung aufklart und **128** als gelber Feststoff ausfällt. Das Produkt wird abfiltriert, mit wenig MeOH gewaschen und im Vakuum getrocknet.

<sup>xxi</sup> Ein eq des Lösungsmittels (sichtbar im <sup>1</sup>H-NMR) wurde in die Elementaranalyse mit eingerechnet.

**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:**

<b>Ausbeute:</b>	1.50 g (85%)	Theorie: 1.76 g
<b>DC:</b>	DCM/MeOH = 5:1 + 1% HOAc	R <sub>f</sub> = 0.56
<b>Schmelzpunkt:</b>	251-253 °C (zers.)	Lit.: unbekannt
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10.38 (s, 1H, NH*), 9.72 (s, 1H, NH*), 8.18 (d, 1H, J = 1.7, Py-H), 7.61 (d, 1H, J = 2.0, Py-H), 7.25 (d, 1H, J = 1.7, Py-H), 7.02 (d, 1H, J = 1.8, Py-H), 6.99 (d, 1H, J = 1.7, Py-H), 6.42 (d, 1H, J = 1.9, Py-H), 3.96 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 3.84 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 3.83 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> )	
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(δ[ppm], 75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 161.78, 158.23, 156.81, 133.69, 128.04, 126.19, 122.78, 122.50, 121.37, 120.18, 119.44, 118.58, 108.36, 107.53, 104.57, 37.32, 35.98, 35.97	
<b>IR (KBr):</b>	3382 (m), 3137 (s), 2955 (m), 1690 (s), 1649 (s), 1594 (s), 1562 (s), 1524 (s), 1500 (s), 1439 (s), 1420 (s), 1354 (m), 1310 (s), 1258 (s), 1209 (s), 1110 (s), 1060 (m), 1006 (w), 988 (w), 888 (m), 815 (m), 779 (m), 751 (m), 708 (m), 668 (m), 644 (m), 594 (m)	
<b>Masse:</b>	ESI– (berechnet für C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> –H <sup>+</sup> ): berechnet: 413.1 gefunden: 413.1	

### 10.5.27 3-(tert.-Butyloxycarbonylaminopropyl)-3'-aminopropyl-N-methylamine (**133**)



Zu einer Lösung von 29.55 ml (183.3 mmol, 4 eq) **132** in 50 ml Dioxan tropft man langsam eine zweite Lösung von 10.00 g (45.82 mmol)  $\text{Boc}_2\text{O}$  in 50 ml Dioxan. Nach beendeter Zugabe rührt man 2 h bei RT, und danach weitere 3 h bei 60 °C. Man lässt die Reaktionslösung erkalten und rührt über Nacht wieder bei RT. Das Lösungsmittel wird evaporiert, der Rückstand mit 60 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und 4x mit je 40 ml DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden mit 40 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und aufkonzentriert. Der ölige Rückstand wird im Vakuum destilliert (1 mbar, 200 °C Ölbad). Man erhält **133** als farbloses, zähflüssiges Öl.

#### ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

<b>Ausbeute:</b>	8.84 g (79 %)	Theorie: 11.24 g
<b>DC:</b>	DCM/MeOH = 1:1 + $\text{NH}_3$	$R_f = 0.29$
<b><math>^1\text{H-NMR}</math>:</b>	( $\delta$ [ppm], 250 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ): 6.77 (t, 1H, $J = 5.8$ , $\text{NH}^*$ ), 2.90 (q, 2H, $J = 6.1$ , $\text{NHCH}_2$ , $\text{D}_2\text{O}$ : q→t), 2.51 (t, 2H, $J = 6.7$ , $\text{H}_2\text{NCH}_2$ ), 2.29-2.17 (m, 4H, $2 \times \text{N}(\text{Me})\text{CH}_2$ ), 2.07 (s, 3H, $\text{NCH}_3$ ), 1.54-1.38 (m, 4H, $2 \times \text{N}(\text{Me})\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.35 (s, 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ )	
<b><math>^{13}\text{C-NMR}</math>:</b>	( $\delta$ [ppm], 75 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ): 155.42, 77.14, 54.95, 54.77, 41.72, 39.87, 38.26, 30.80, 28.13, 27.08	
<b>IR (KBr):</b>	3354 (m), 2936 (s), 2867 (m), 2796 (m), 1698 (s), 1526 (s), 1458 (m), 1390 (m), 1365 (s), 1275 (s), 1251 (s), 1174 (s), 1049 (m), 864 (w), 778 (w)	
<b>Masse:</b>	ESI+ (berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2 + \text{H}^+$ ): berechnet: 246.2	

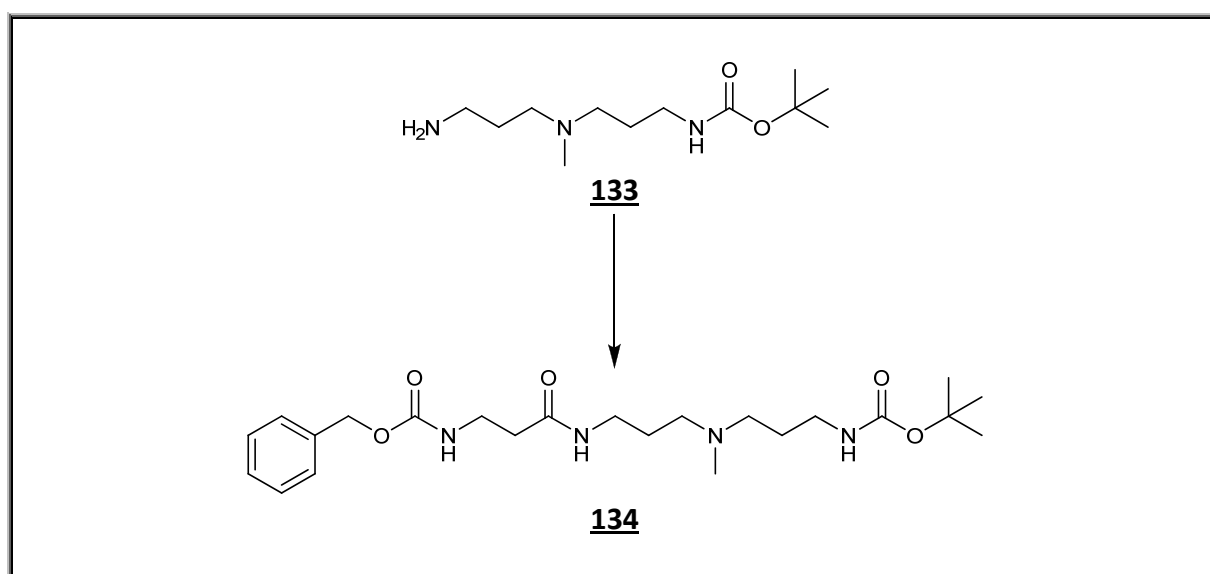
gefunden: 246.0

**Elementaranalyse:**  $C_{12}H_{27}N_3O_2$

berechnet: C: 58.74                      H: 11.09                      N: 17.13

gefunden: C: 58.89                      H: 10.90                      N: 17.32

**10.5.28 3-(Benzyloxycarbonylamino)-propionsäure-(3-(N-methyl-N-(3-tert.-butyl oxycarbonylaminopropyl)-aminopropyl)-amid (134))**



3.00 g (12.23 mmol) **133** und 3.28 g (14.67 mmol, 1.2 eq) Cbz-β-Alanin werden in 20 ml abs. DMF gelöst und im Anschluss mit 4.19 ml (24.45 mmol, 2 eq) DIEA versetzt. Zu dieser Mischung gibt man dann 2.26 g (14.67 mmol, 1.2 eq) HOBt, erwärmt auf 60 °C, tropft 3.79 ml (24.45 mmol, 2 eq) DIC hinzu und rührt für 4 h bei 60 °C. Die auf RT abgekühlte Lösung wird zu 100 ml einer 4:1-Mischung von H<sub>2</sub>O und ges. NaHCO<sub>3</sub> getropft und die wässrige Lösung 3x mit je 40 ml DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel evaporiert, der Rückstand filtriert und an Kieselgel adsorbiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (200 g Kieselgel, Laufmittel: EtOAc/MeOH = 6:1 + 1% NEt<sub>3</sub>) erhält man **134** als farbloses Öl.

**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:**

**Ausbeute:** 4.81 g (87 %)

Theorie: 5.51 g

**DC:** EtOAc/MeOH = 2:1 + 1% NEt<sub>3</sub> R<sub>f</sub> = 0.33

**<sup>1</sup>H-NMR:** (δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
7.83 (t, 1H, *J* = 5.4, β-NH\*), 7.38-7.30 (m, 5H, 5x Aryl-H), 7.21 (t, 1H, *J* = 5.5, CbzNH\*), 6.77 (t, 1H, *J* = 5.2, BocNH\*), 5.00 (s, 2H, COOCH<sub>2</sub>), 3.20 (q, 2H, *J* = 6.4, β-C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O: q→t), 3.04 (q, 2H, *J* = 6.0, β-NHCH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O: q→t), 2.92 (q, 2H, *J* = 6.3, BocNHCH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O: q→t), 2.26-2.22 (m, 6H, β-C<sup>2</sup>H<sub>2</sub> + 2x N(Me)CH<sub>2</sub>), 2.08 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.45-1.54 (m, 4H, 2x N(Me)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.36 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

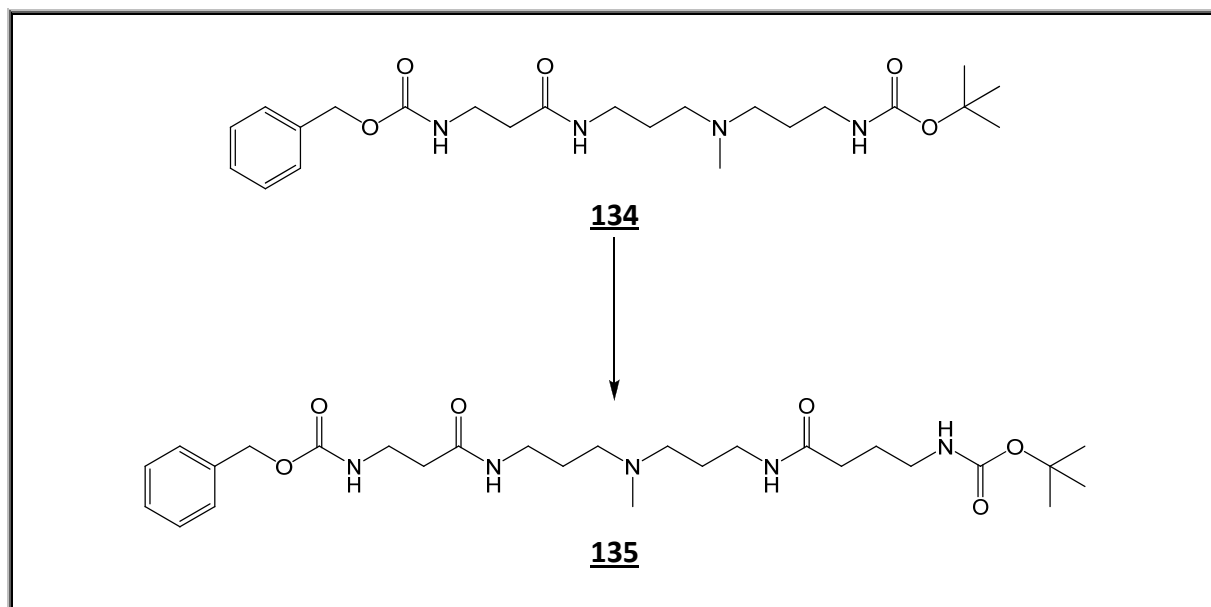
**<sup>13</sup>C-NMR:** (δ[ppm], 75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
169.82, 155.87, 155.46, 137.09, 128.19, 127.59, 127.54, 77.20, 65.04, 54.71, 54.63, 41.56, 38.19, 37.07, 36.74, 35.60, 28.14, 27.07, 26.72

**IR (Film):** 3323 (s), 3066 (m), 2943 (m), 2799 (m), 1700 (s), 1654 (s), 1533 (s), 1456 (m), 1391 (m), 1365 (m), 1252 (s), 1171 (s), 1058 (m), 1004 (m), 860 (w), 777 (w), 738 (m), 698 (m)

**Masse:** MALDI+ (berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>+H<sup>+</sup>):  
berechnet: 451.3  
gefunden: 451.0

**Elementaranalyse:** C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>  
berechnet: C: 61.31 H: 8.50 N: 12.43  
gefunden: C: 61.06 H: 8.64 N: 12.17

**10.5.29 4-(tert.-Butyloxycarbonylamino)-N-(3'-{[3''-(3'''-benzyloxycarbonyl-amino-propionylamino)-propyl]-methyl-amino}-propyl)butansäureamid (135)**



1.50 g (3.33 mmol) 134 werden in 5 ml abs. MeOH gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung tropft man dann eine eisgekühlte Mischung aus 2 ml abs. MeOH und 1 ml Acetylchlorid, rührt für 30 min bei 0 °C, erwärmt dann auf RT und rührt weitere 60 min. Danach kontrolliert man die Entfernung der Schutzgruppe per DC, (gibt bei unvollständiger Reaktion noch 1 ml der obigen Mischung von MeOH und Acetylchlorid hinzu), evaporiert bei vollständiger Reaktion das Lösungsmittel und trocknet im Vakuum.

Das soeben entschützte Amin und 0.81 g (3.99 mmol, 1.2 eq) Boc-GABA werden in 10 ml abs. DMF gelöst und im Anschluss mit 2.28 ml (13.32 mmol, 4 eq) DIEA versetzt. Zu dieser Mischung gibt man dann 0.62 g (3.99 mmol, 1.2 eq) HOBt, erwärmt auf 60 °C, tropft 1.03 ml (6.66 mmol, 2 eq) DIC hinzu und rührt für 4 h bei 60 °C. Die auf RT abgekühlte Lösung wird zu 50 ml einer 4:1-Mischung von H<sub>2</sub>O und ges. NaHCO<sub>3</sub> getropft und die wässrige Lösung 3x mit je 30 ml DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel evaporiert, der Rückstand filtriert und an Kieselgel adsorbiert. Nach säulen-chromatographischer Aufreinigung (150 g Kieselgel, Laufmittel: EtOAc/MeOH = 6:1 + 1% NEt<sub>3</sub>) erhält man 135 als farbloses Öl.

**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:**

**Ausbeute:** 1.51 g (85 %)

Theorie: 1.78 g



**DC:** EtOAc/MeOH = 2:1 + 1% NEt<sub>3</sub> R<sub>f</sub> = 0.39

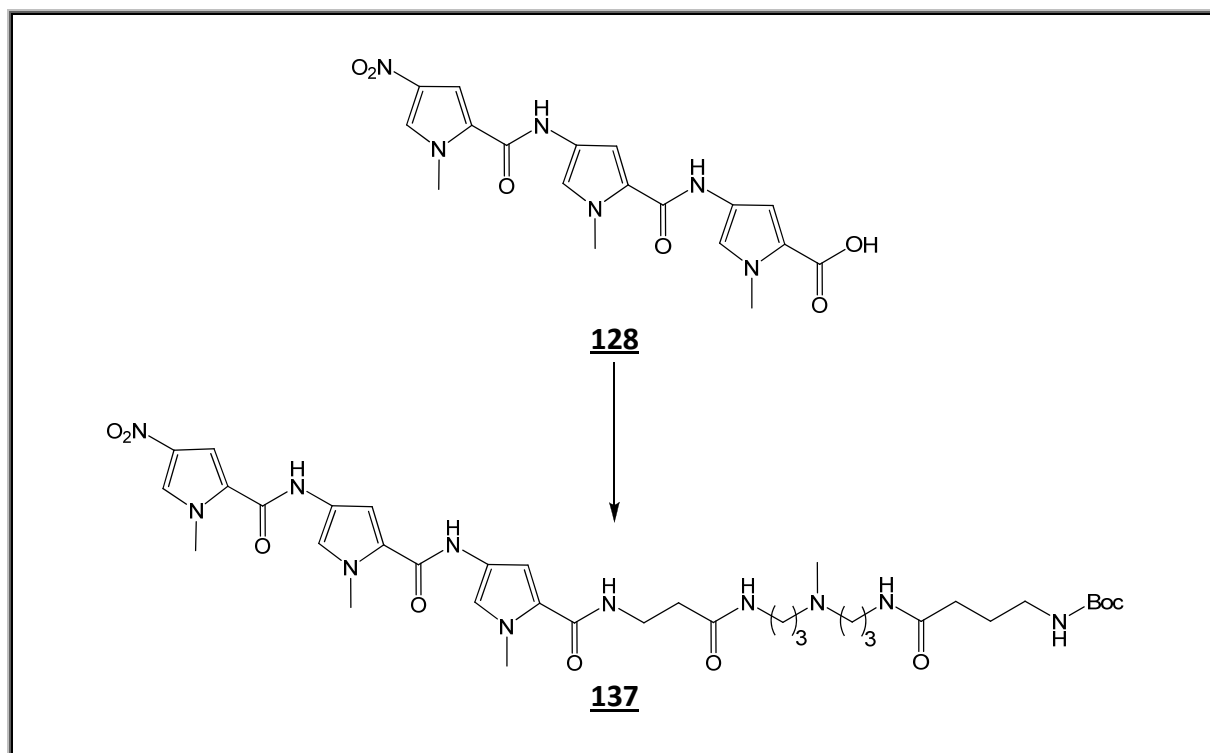
**<sup>1</sup>H-NMR:** (δ[ppm], 300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
 7.84 (t, 1H, *J* = 5.4, N(Me)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH\*), 7.76 (t, 1H, *J* = 5.4, N(Me)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH\*), 7.36-7.29 (m, 5H, 5x Aryl-*H*), 7.19 (t, 1H, *J* = 5.2, CbzNH\*), 6.75 (t, 1H, *J* = 5.2, γ-C<sup>4</sup>NH\*), 5.00 (s, 2H, COOCH<sub>2</sub>), 3.20 (q, 2H, *J* = 6.3, β-C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O: q→t), 3.10-3.00 (m, 4H, 2x N(Me)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O: m→t), 2.89 (q, 2H, *J* = 6.4, γ-C<sup>4</sup>H<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O: q→t), 2.30-2.20 (m, 6H, β-C<sup>2</sup>H<sub>2</sub> / 2x N(Me)CH<sub>2</sub>), 2.09 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.04 (t, 2H, *J* = 7.5, γ-C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>), 1.64-1.45 (m, 6H, γ-C<sup>3</sup>H<sub>2</sub> / 2x N(Me)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.37 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR:** (δ[ppm], 75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
 171.54, 169.90, 155.90, 155.47, 137.10, 128.20, 127.60, 127.56, 77.30, 65.06, 54.64, 41.54, 39.57, 37.10, 36.71, 35.62, 32.83, 28.14, 26.76, 26.71, 25.76

**IR (Film):** 3325 (s), 3067 (m), 2939 (m), 2796 (m), 1686 (s), 1637 (s), 1542 (s), 1456 (m), 1365 (m), 1278 (s), 1169 (s), 1046 (m), 1000 (m), 872 (w), 856 (w), 777 (w), 730 (m), 694 (m)

**Masse:** ESI+ (berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>):  
 berechnet: 536.3  
 gefunden: 536.4

**Elementaranalyse:** C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>  
 berechnet: C: 60.54 H: 8.47 N: 13.07  
 gefunden: C: 60.27 H: 8.53 N: 12.96

**10.5.30 O<sub>2</sub>N-Py-Py-Py-β-C<sub>3</sub>-N(Me)-C<sub>3</sub>-γ-Boc (137)**

1 g (2.22 mmol) **135** wird in 10 ml abs. MeOH gelöst, zu einer Suspension von 0.1 g Pd/C (10%ig) in 10 ml abs. MeOH gegeben und bei 30 bar H<sub>2</sub>-Druck und 40 °C für 3 h gerührt. Die Suspension wird auf RT abgekühlt, bei vollständiger Reaktion in einer Schlenkfritte unter Ar über Celite filtriert und das Lösungsmittel evaporiert.

Das soeben entschützte Amin und 1.24 g (2.99 mmol, 1.2 eq) **128** werden in 10 ml abs. DMF gelöst und mit 1.28 ml (7.47 mmol, 3 eq) DIEA versetzt. Zu dieser Mischung gibt man dann 0.46 g (2.99 mmol, 1.2 eq) HOBt, erwärmt auf 60 °C, tropft 0.77 ml (4.98 mmol, 2 eq) DIC hinzu und rührt für 4 h bei 60 °C. Die auf RT abgekühlte Lösung wird zu 50 ml einer 4:1-Mischung von H<sub>2</sub>O und ges. NaHCO<sub>3</sub> getropft und die wässrige Lösung 3x mit je 30 ml DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel evaporiert, der Rückstand filtriert und an Kieselgel adsorbiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (100 g Kieselgel, Laufmittel: DCM/MeOH = 9:1 + 1% NEt<sub>3</sub>) erhält man **137** als gelben Schaum.

**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:****Ausbeute:** 1.42 g (71 %)

Theorie: 1.99 g

**DC:** DCM/MeOH = 9:1 + 1% NEt<sub>3</sub>R<sub>f</sub> = 0.15

**<sup>1</sup>H-NMR:**(δ[ppm], 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):

10.28 (s, 1H, ArCONHAr), 9.94 (s, 1H, ArCONHAr), 8.18 (d, 1H,  $J = 1.9$ , Py-H), 8.00 (t, 1H,  $J = 5.5$ , β-C<sup>3</sup>NH\*), 7.88 (t, 1H,  $J = 5.4$ , N(Me)C<sup>3'</sup>NH\*), 7.76 (t, 1H,  $J = 5.3$ , N(Me)C<sup>3</sup>NH\*), 7.59 (d, 1H,  $J = 2.0$ , Py-H), 7.27 (d, 1H,  $J = 1.7$ , Py-H), 7.20 (d, 1H,  $J = 1.7$ , Py-H), 7.03 (d, 1H,  $J = 1.8$ , Py-H), 6.83 (d, 1H,  $J = 1.7$ , Py-H), 6.77 (t, 1H,  $J = 5.3$ , γ-C<sup>4</sup>NH\*), 3.97 (s, 3H, Py-CH<sub>3</sub>), 3.86 (s, 3H, Py-CH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 3H, Py-CH<sub>3</sub>), 3.36 (q, 2H,  $J = 6.1$ , β-C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O: q→t), 3.10-3.00 (m, 4H, 2x N(Me)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O: m→t), 2.88 (q, 2H,  $J = 6.4$ , γ-C<sup>4</sup>H<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O: q→t), 2.33 (t, 2H, β-C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>), 2.25-2.23 (m, 4H, 2x N(Me)CH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O: m→t), 2.09 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.03 (t, 2H,  $J = 7.6$ , γ-C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>), 1.61-1.47 (m, 6H, γ-C<sup>3</sup>H<sub>2</sub> + 2x N(Me)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.36 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR:**(δ[ppm], 75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):

171.55, 170.30, 161.13, 158.23, 156.82, 155.47, 133.71, 128.12, 126.21, 122.96, 122.73, 121.99, 121.31, 118.51, 117.86, 107.49, 104.41, 104.06, 77.33, 54.66, 41.57, 39.49, 37.38, 36.73, 36.08, 35.87, 35.46, 35.40, 32.83, 28.16, 26.77, 25.76

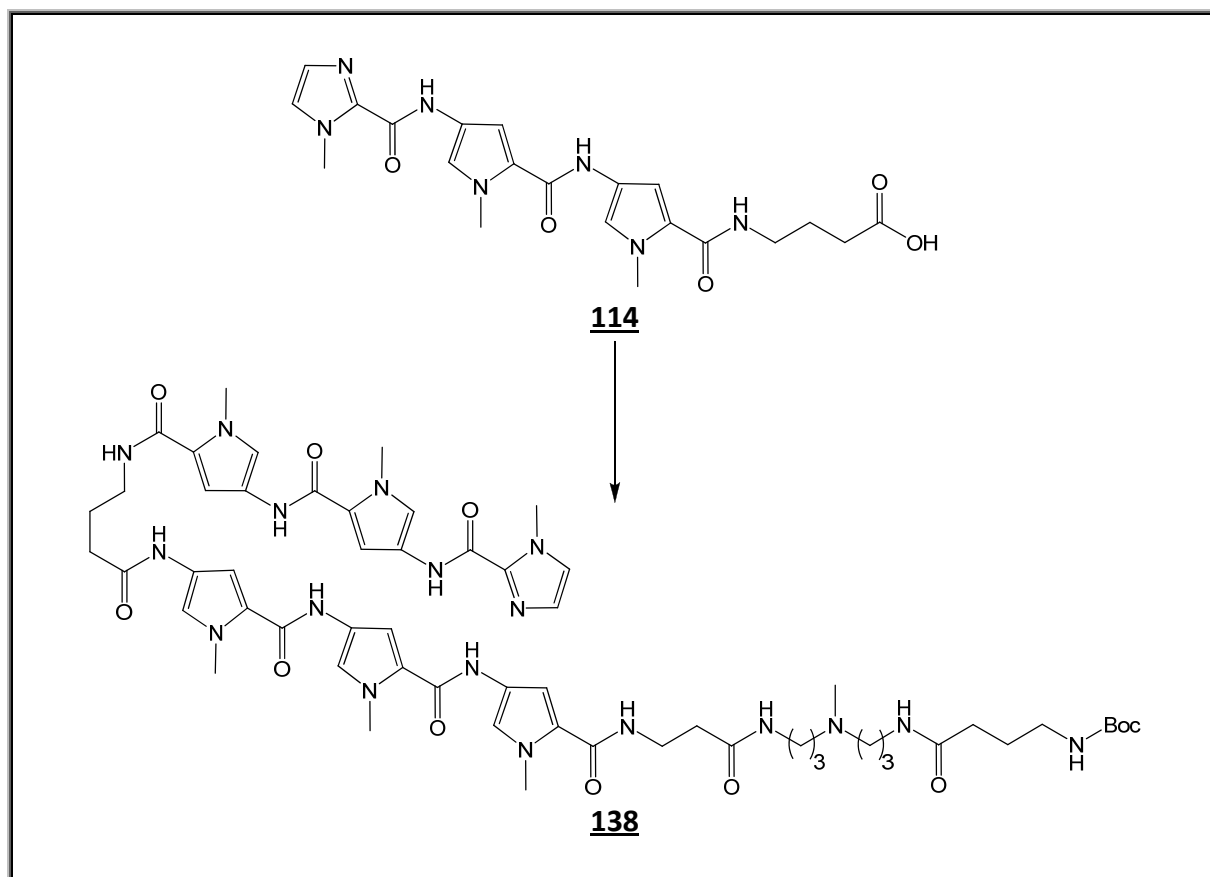
**IR (KBr):**

3307 (s), 3126 (m), 2939 (m), 2803 (m), 1646 (s), 1534 (s), 1465 (s), 1437 (s), 1402 (s), 1365 (s), 1310 (s), 1253 (s), 1206 (m), 1166 (s), 1114 (m), 1061 (m), 1004 (m), 887 (w), 855 (w), 814 (m), 776 (m), 752 (m), 712 (m), 668 (m), 607 (m)

**Masse:**ESI+ (berechnet für C<sub>37</sub>H<sub>55</sub>N<sub>11</sub>O<sub>9</sub>+H<sup>+</sup>):

berechnet: 798.4

gefunden: 798.6

10.5.31 Im-Py-Py-γ-Py-Py-Py-β-C<sub>3</sub>-N(Me)-C<sub>3</sub>-γ-Boc (**138**)

0.50 g (0.63 mmol) **137** werden mit 5 ml abs. MeOH aufgenommen, zu einer Suspension von 50 mg Pd/C (10%ig) in 10 ml abs. MeOH gegeben und bei 50 °C und 40 bar H<sub>2</sub>-Druck für 3 h gerührt. Die erkaltete Suspension wird über Celite filtriert, und das Lösungsmittel im Vakuum evaporiert. Das nun zum Amin reduzierte Molekül wird dann mit 5 ml abs. DMF aufgenommen und zu einer Mischung von 0.31 g (0.69 mmol, 1.1 eq) **114**, 0.11 g (0.72 mmol, 1.15 eq) HOBt und 0.32 ml (1.88 mmol, 3 eq) DIEA in 5 ml abs. DMF gegeben. Nach dem Erwärmen auf 60 °C werden 0.19 ml (1.25 mmol, 2 eq) DIC zugegeben und 3 h bei 60 °C gerührt. Die auf RT abgekühlte Lösung wird zu 50 ml einer 4:1-Mischung von H<sub>2</sub>O und ges. NaHCO<sub>3</sub> getropft, 20 ml MeOH zugegeben und die wässrige Lösung 3x mit je 30 ml DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel evaporiert, der Rückstand filtriert und an Kieselgel adsorbiert. Nach zweifacher Säulenchromatographie (Säule 1: 50 g Kieselgel, Laufmittel 1: EtOAc/MeOH = 1:1 + 1% NEt<sub>3</sub>; Säule 2: 50 g Kieselgel, Laufmittel 2: EtOAc/MeOH = 1:1 + 1% NH<sub>3</sub>) erhält man **138** als beigefarbenen Schaum.

**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:**

**Ausbeute:** 0.62 g (82 %) Theorie: 0.76 g

**DC:** EtOAc/MeOH = 1:1 + 1% NEt<sub>3</sub> R<sub>f</sub> = 0.16

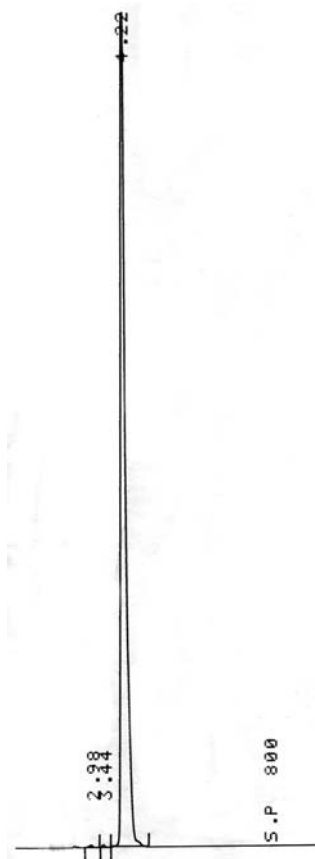
**<sup>1</sup>H-NMR:** (δ[ppm], 250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
 10.42 (s, 1H, ArCONHAr\*), 9.91 (s, 1H, ArCONHAr\*), 9.90 (s, 1H, ArCONHAr\*), 9.88 (s, 1H, ArCONHAr\*), 9.84 (s, 1H, ArCONHAr\*), 8.05 (t, 1H, *J* = 5.7, γ<sub>1</sub>-C<sup>4</sup>NH\*), 7.99 (t, 1H, *J* = 5.7, β-C<sup>3</sup>NH\*), 7.87 (t, 1H, *J* = 5.6, N(Me)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N'H\*), 7.76 (t, 1H, *J* = 5.5, N(Me)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH\*), 7.38 (d, 1H, *J* = 0.8, Py-H), 7.29 (d, 1H, *J* = 1.8, Py-H), 7.23 (d, 1H, *J* = 1.7, Py-H), 7.21-7.17 (m, 3H, 3x Py-H), 7.16 (d, 1H, *J* = 1.8, Py-H), 7.04-7.03 (m, 2H, 2x Py-H), 6.91 (d, 1H, *J* = 1.8, Py-H), 6.88 (d, 1H, *J* = 1.8, Py-H), 6.83 (d, 1H, *J* = 1.7, Py-H), 6.77 (t, 1H, *J* = 5.9, γ<sub>2</sub>-C<sup>4</sup>NH\*), 3.99 (s, 3H, Py-CH<sub>3</sub>), 3.85 (s, 3H, Py-CH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 3H, Py-CH<sub>3</sub>), 3.83 (s, 3H, Py-CH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3H, Py-CH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 3H, Py-CH<sub>3</sub>), 3.36 (q, 2H, *J* = 5.9, β-C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O: q→t), 3.22 (q, 2H, *J* = 5.6, γ<sub>1</sub>-C<sup>4</sup>H<sub>2</sub>), 3.10-2.99 (m, 4H, 2x N(Me)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O: m→t), 2.88 (q, 2H, *J* = 6.4, γ<sub>2</sub>-C<sup>4</sup>H<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O: q→t), 2.35-2.21 (m, 8H, β-C<sup>2</sup>H<sub>2</sub> / γ<sub>1</sub>-C<sup>2</sup>H<sub>2</sub> / 2x N(Me)CH<sub>2</sub>), 2.08 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.03 (t, 2H, *J* = 7.5, γ<sub>2</sub>-C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>), 1.80 (qn, 2H, *J* = 6.5, γ<sub>1</sub>-C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>), 1.63-1.44 (m, 6H, γ<sub>2</sub>-C<sup>3</sup>H<sub>2</sub> / 2x N(Me)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.36 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR:** (δ[ppm], 75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  
 171.49, 170.24, 169.14, 161.21, 161.12, 158.34, 156.00, 155.44, 138.69, 126.88, 126.21, 122.95, 122.86, 122.70, 122.65, 122.62, 122.06, 122.01, 121.99, 121.94, 121.32, 118.51, 118.33, 118.06, 117.77, 117.72, 104.83, 104.58, 104.20, 104.05, 103.86, 77.28, 54.65, 41.48, 39.47, 38.08, 36.71, 35.97, 35.94, 35.82, 35.44, 35.37, 34.97, 33.20, 32.81, 28.13, 26.79, 26.77, 25.73, 25.59

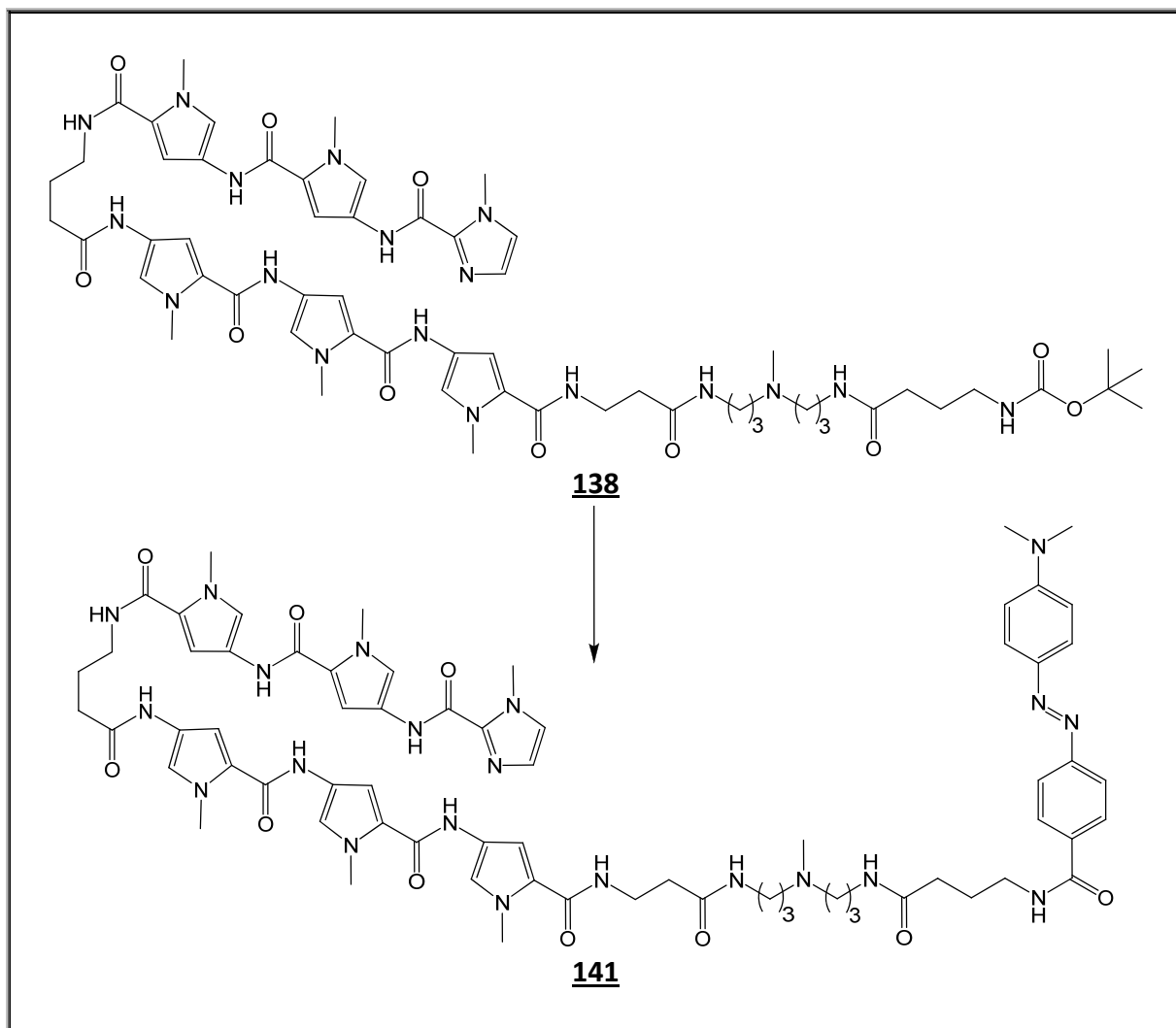
**IR (KBr):** 3304 (s), 3127 (m), 2936 (m), 2871 (m), 2801 (w), 1648 (s), 1583 (s), 1534 (s), 1466 (s), 1434 (s), 1402 (s), 1365 (s), 1254 (s), 1206 (m), 1165 (m), 1121 (m), 1102 (m), 1061 (m), 1004 (w), 930 (w), 884 (w), 806 (m), 775 (m), 695 (m), 668 (m), 634 (m), 608 (m)

**Masse:** ESI+ (berechnet für  $C_{58}H_{80}N_{18}O_{11}+H^+$ ):  
 berechnet: 1205.6  
 gefunden: 1205.8 (23.09,  $M+H^+$ )  
 1105.9 (100.00,  $M+H^+$ , -Boc)  
 603.2 (12.98,  $M+2H^+$ )  
 553.3 (48.33,  $M+2H^+$ , -Boc)

**Elementaranalyse:**  $C_{58}H_{80}N_{18}O_{11}$   
 berechnet: C: 57.79 H: 6.69 N: 20.92  
 Eine korrekte Elementaranalyse konnte auch nach HPLC-Aufreinigung  
 nicht erhalten werden (siehe *Abbildung 10-12*)



**Abbildung 10-12:** ELSD-Spur einer isokratischen HPLC-Analytik von **138** (0.1% TFA in  $H_2O$  /  $CH_3CN$  = 67:33). Die Substanz ist vorher semipräparativ aufgereinigt worden (0.1% TFA in  $H_2O$  /  $CH_3CN$  = 71:29).

**10.5.32 Im-Py-Py-γ-Py-Py-Py-β-C<sub>3</sub>-N(Me)-C<sub>3</sub>-γ-DABCYL (141)**

3 ml abs. MeOH werden auf 0 °C gekühlt und langsam 1 ml Acetylchlorid zugetropft. Die entstehende Lösung wird noch weitere 30 min bei 0 °C gerührt, und dann eine Lösung von 0.100 g (0.08 mmol) **138** in 1 ml abs. MeOH zugegeben. Die gelbe Lösung wird 30 min bei 0 °C und weitere 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird evaporiert und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

Das soeben entschützte Amin und 0.045 g (0.17 mmol, 2 eq) DABCYL werden in 2 ml abs. DMF gelöst und dann 0.26 ml (1.49 mmol, 18 eq) DIEA hinzugegeben. 0.015 g (0.10 mmol, 1.2 eq) HOBt werden hinzugegeben, die Reaktionslösung auf 60 °C erwärmt und dann 0.026 ml (0.17 mmol, 2 eq) DIC hinzu getropft. Nach 3 h kühlt man die Reaktionslösung auf RT ab, tropft sie zu 50 ml einer 4:1-Mischung von H<sub>2</sub>O und ges. NaHCO<sub>3</sub> und extrahiert die wässrige Lösung nach Zugabe von 10 ml MeOH 3x mit je 15 ml DCM. Die vereinigten org. Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel evaporiert, der Rückstand filtriert und an Kieselgel adsorbiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (50 g Kieselgel, Laufmittel: EtOAc/MeOH = 1:1 + 1% NH<sub>3</sub>) erhält man **141** als roten Feststoff.

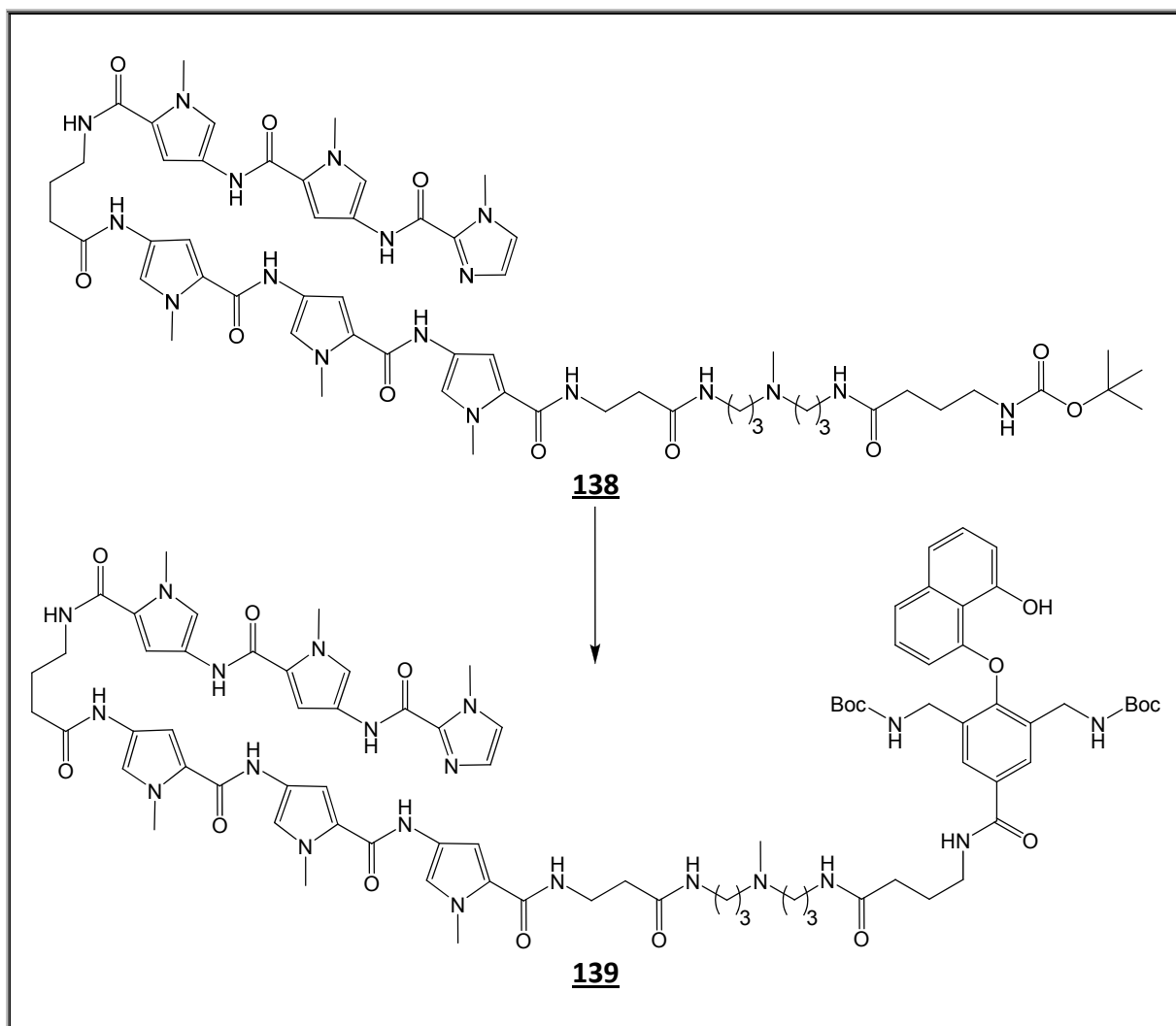
**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:**

<b>Ausbeute:</b>	0.06 g (54 %)	Theorie: 0.11 g
<b>DC:</b>	EtOAc/MeOH = 1:1 + 1% NH <sub>3</sub>	R <sub>f</sub> = 0.19
<b>Schmelzpunkt:</b>	157-159 °C	Lit.: unbekannt
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(δ[ppm], 400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10.45 (s, 1H, ArCONHAr*), 9.93 (s, 1H, ArCONHAr*), 9.92 (s, 1H, ArCONHAr*), 9.90 (s, 1H, ArCONHAr*), 9.87 (s, 1H, ArCONHAr*), 8.59 (t, 1H, <i>J</i> = 5.9, γ <sub>2</sub> -C <sup>4</sup> NH*), 8.06 (t, 1H, <i>J</i> = 5.6, γ <sub>1</sub> -C <sup>4</sup> NH*), 8.01-7.95 (m, 3H, β-C <sup>3</sup> NH* / 2x DABCYL-Ar-H), 7.92-7.77 (m, 6H, N(Me)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N'H* / N(Me)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH* / 4x DABCYL-Ar-H), 7.39 (d, 1H, <i>J</i> = 0.5, Py-H), 7.29 (d, 1H, <i>J</i> = 1.7, Py-H), 7.24 (d, 1H, <i>J</i> = 1.6, Py-H), 7.21-7.15 (m, 4H, 4x Py-H), 7.04 (m, 2H, 2x Py-H), 6.92 (d, 1H, <i>J</i> = 1.7, Py-H), 6.89-6.80 (m, 4H, 2x DABCYL-Ar-H / 2x Py-H), 3.99 (s, 3H, Py-CH <sub>3</sub> ), 3.85 (s, 3H, Py-CH <sub>3</sub> ), 3.84 (s, 3H, Py-CH <sub>3</sub> ), 3.83 (s, 3H, Py-CH <sub>3</sub> ), 3.81 (s, 3H, Py-CH <sub>3</sub> ), 3.80 (s, 3H, Py-CH <sub>3</sub> ), 3.40-3.15 (m, 6H, β-C <sup>3</sup> H <sub>2</sub> / γ <sub>2</sub> -C <sup>4</sup> H <sub>2</sub> / γ <sub>1</sub> -C <sup>4</sup> H <sub>2</sub> ), 3.10-3.00 (m, 10H, Ar-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> / 2x N(Me)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.36-2.20 (m, 8H, γ <sub>1</sub> -C <sup>2</sup> H <sub>2</sub> / β-C <sup>2</sup> H <sub>2</sub> / 2x N(Me)CH <sub>2</sub> ), 2.14 (t, 2H, <i>J</i> = 7.5, γ <sub>2</sub> -C <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ), 2.08 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ), 1.82-1.72 (m, 4H, γ <sub>2</sub> -C <sup>3</sup> H <sub>2</sub> / γ <sub>1</sub> -C <sup>3</sup> H <sub>2</sub> ), 1.58-1.44 (m, 4H, 2x N(Me)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )	
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(δ[ppm], 75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 171.56, 170.24, 169.15, 165.47, 161.12, 158.34, 156.00, 153.80, 152.70, 142.54, 138.69, 134.77, 128.16, 126.88, 126.21, 124.94, 122.96, 122.87, 122.71, 122.66, 122.62, 122.07, 122.02, 121.99, 121.95, 121.34, 121.32, 118.51, 118.33, 118.06, 117.76, 117.72, 111.45, 104.83, 104.59, 104.20, 104.05, 103.88, 54.66, 41.58, 39.68, 38.97, 38.07, 36.74, 35.97, 35.94, 35.81, 35.45, 35.37, 34.96, 33.21, 32.98, 26.80, 26.77, 25.59, 25.58, 25.26	
<b>IR (KBr):</b>	3313 (s), 3123 (m), 2938 (m), 2872 (m), 2803 (w), 1639 (s), 1598 (s), 1585 (s), 1535 (s), 1510 (s), 1466 (s), 1438 (s), 1400 (s), 1363 (s), 1285 (m), 1258 (m), 1207 (m), 1138 (m), 1065 (m), 1008 (w), 945 (w), 883 (w), 858 (w), 821 (m), 804 (m), 776 (m), 676 (m), 626 (m), 609 (m)	



**Masse:** ESI+ (berechnet für  $C_{68}H_{85}N_{21}O_{10}+H^+$ ):  
 berechnet: 1356.7  
 gefunden: 1357.1

### 10.5.33 Im-Py-Py-γ-Py-Py-Py-β-C<sub>3</sub>-N(Me)-C<sub>3</sub>-γ-87 (**139**)



5 ml abs. MeOH werden auf 0 °C gekühlt und langsam 2 ml Acetylchlorid zugetropft. Die entstehende Lösung wird noch weitere 30 min bei 0 °C gerührt, und dann eine Lösung von 0.25 g (0.21 mmol) **138** in 1 ml abs. MeOH zugegeben. Die gelbe Lösung wird 30 min bei 0 °C und weitere 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird evaporiert und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

Das freie Amin wird dann mit 1 ml abs. DMF aufgenommen und zu einer Lösung von 0.13 g (0.25 mmol, 1.2 eq) **88**, 0.64 ml (3.73 mmol, 18 eq) DIEA und 0.04 g (0.25 mmol 1.2 eq) HOBt in 4 ml abs. DMF gegeben. Diese Lösung wird auf 60 °C erwärmt, 0.08 ml (0.52 mmol, 2.5 eq)

DIC zugetropft und danach für 3 h bei 60 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wird die Reaktionslösung in 50 ml einer 4:1-Mischung von H<sub>2</sub>O und ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung getropft, welche mit 20 ml DCM unterschichtet ist. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige noch 2x mit je 20 ml DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel evaporiert und der Rückstand an Kieselgel adsorbiert. Nach zweifacher Säulenchromatographie (Säule 1: 50 g Kieselgel, Laufmittel 1: EtOAc/MeOH = 1:1 + 1% NEt<sub>3</sub>; Säule 2: 30 g Kieselgel, Laufmittel 2: EtOAc/MeOH = 1:1 + 1% NH<sub>3</sub>) erhält man **139** als blass beigefarbenes Pulver.

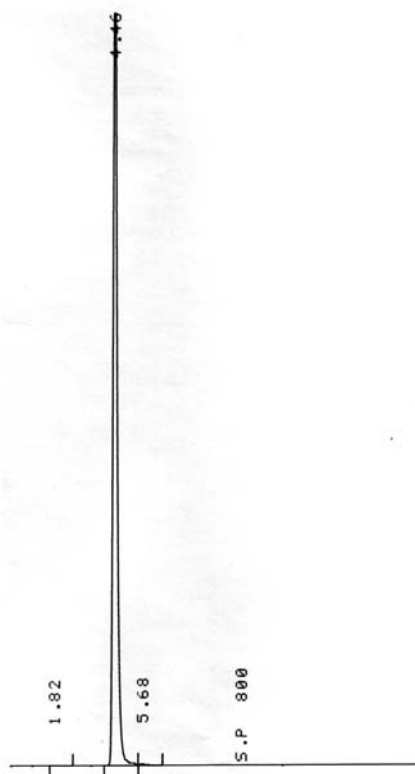
#### ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

**Ausbeute:** 0.21 g (62 %) Theorie: 0.34 g

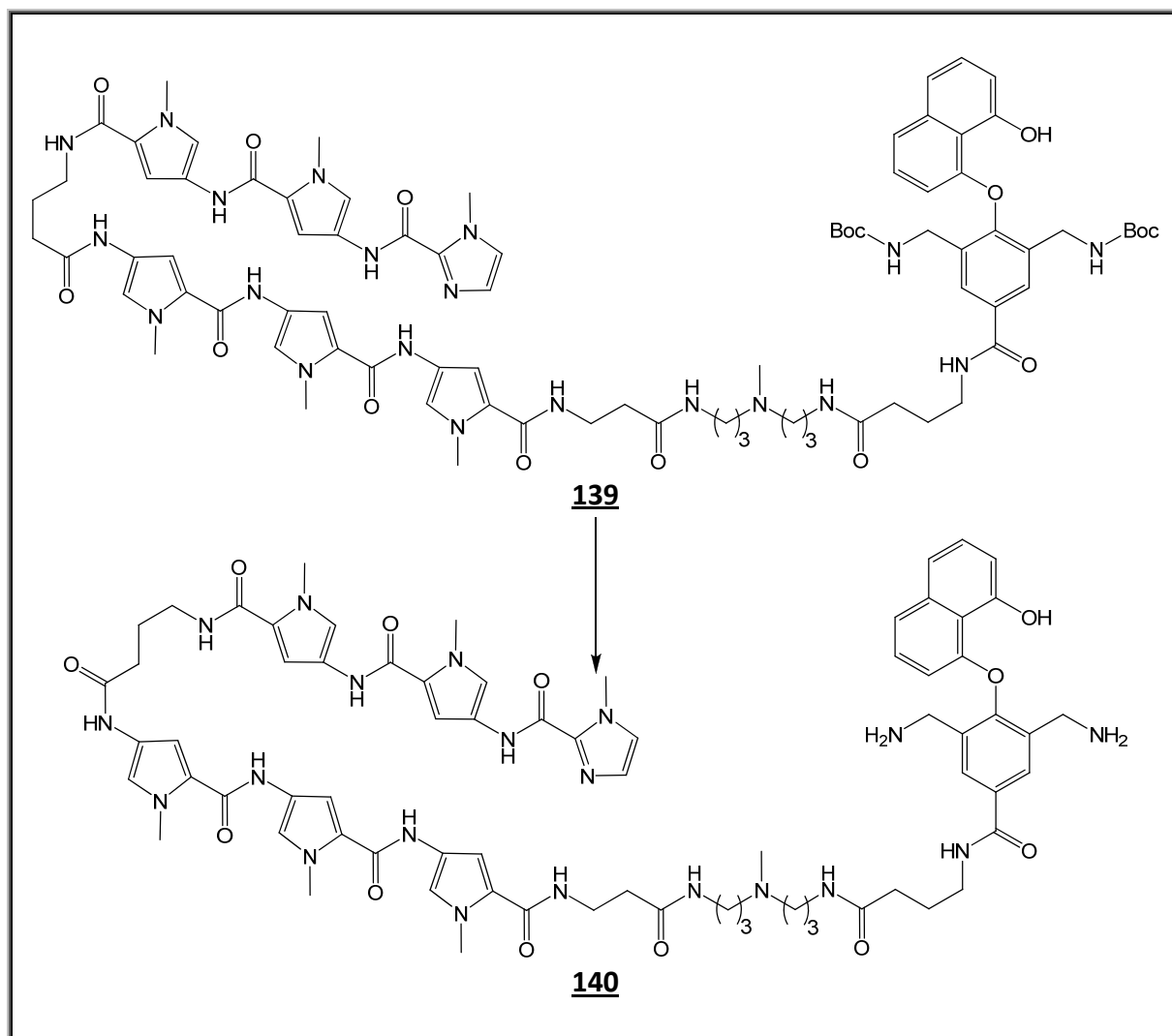
**DC:** EtOAc/MeOH = 1:1 + 1% NEt<sub>3</sub> R<sub>f</sub> = 0.22

**Schmelzpunkt:** 173-175 °C Lit.: unbekannt

**Masse:** ESI+ (berechnet für C<sub>82</sub>H<sub>104</sub>N<sub>20</sub>O<sub>16</sub>+H<sup>+</sup>):  
 berechnet: 1625.8  
 gefunden: 1625.2 (M+H<sup>+</sup>)  
 1567.2 (M+H<sup>+</sup>, -<sup>t</sup>Bu)  
 1525.2 (M+H<sup>+</sup>, -Boc)  
 1467.2 (M+H<sup>+</sup>, -Boc, -<sup>t</sup>Bu)  
 1425.6 (M+H<sup>+</sup>, -2 Boc)  
 813.6 (M+2H<sup>+</sup>)  
 784.6 (M+2H<sup>+</sup>, -<sup>t</sup>Bu)  
 763.8 (M+2H<sup>+</sup>, -Boc)  
 734.6 (M+2H<sup>+</sup>, -Boc, -<sup>t</sup>Bu)  
 713.7 (M+2H<sup>+</sup>, -2 Boc)



**Abbildung 10-13:** Isokratische HPLC-Analytik (0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$  /  $\text{CH}_3\text{CN}$  = 52:48) einer semipräparativ getrennten Probe von **139**. Gezeigt ist die ELSD-Spur.

10.5.34 Im-Py-Py-γ-Py-Py-Py-β-C<sub>3</sub>-N(Me)-C<sub>3</sub>-γ-95 (**140**)

2 ml abs. MeOH werden auf 0 °C gekühlt und langsam 1 ml Acetylchlorid zugetropft. Die entstehende Lösung wird noch weitere 30 min bei 0 °C gerührt, und dann eine Lösung von 0.02 g (0.012 mmol) **139** in 1 ml abs. MeOH zugegeben. Die Lösung wird 30 min bei 0 °C und weitere 30 min bei RT gerührt. Nach Evaporation des Lösungsmittels und trocknen im Vakuum erhält man **140** als blass braunen Feststoff als Trihydrochlorid.

ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:

**Ausbeute:** 0.011g (59 %)

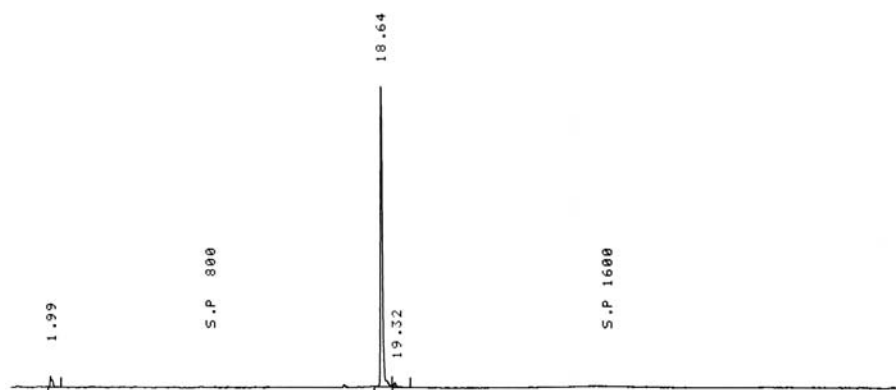
Theorie: 0.018 g

**Masse:** ESI+ (berechnet für C<sub>72</sub>H<sub>88</sub>N<sub>20</sub>O<sub>12</sub>+H<sup>+</sup>):

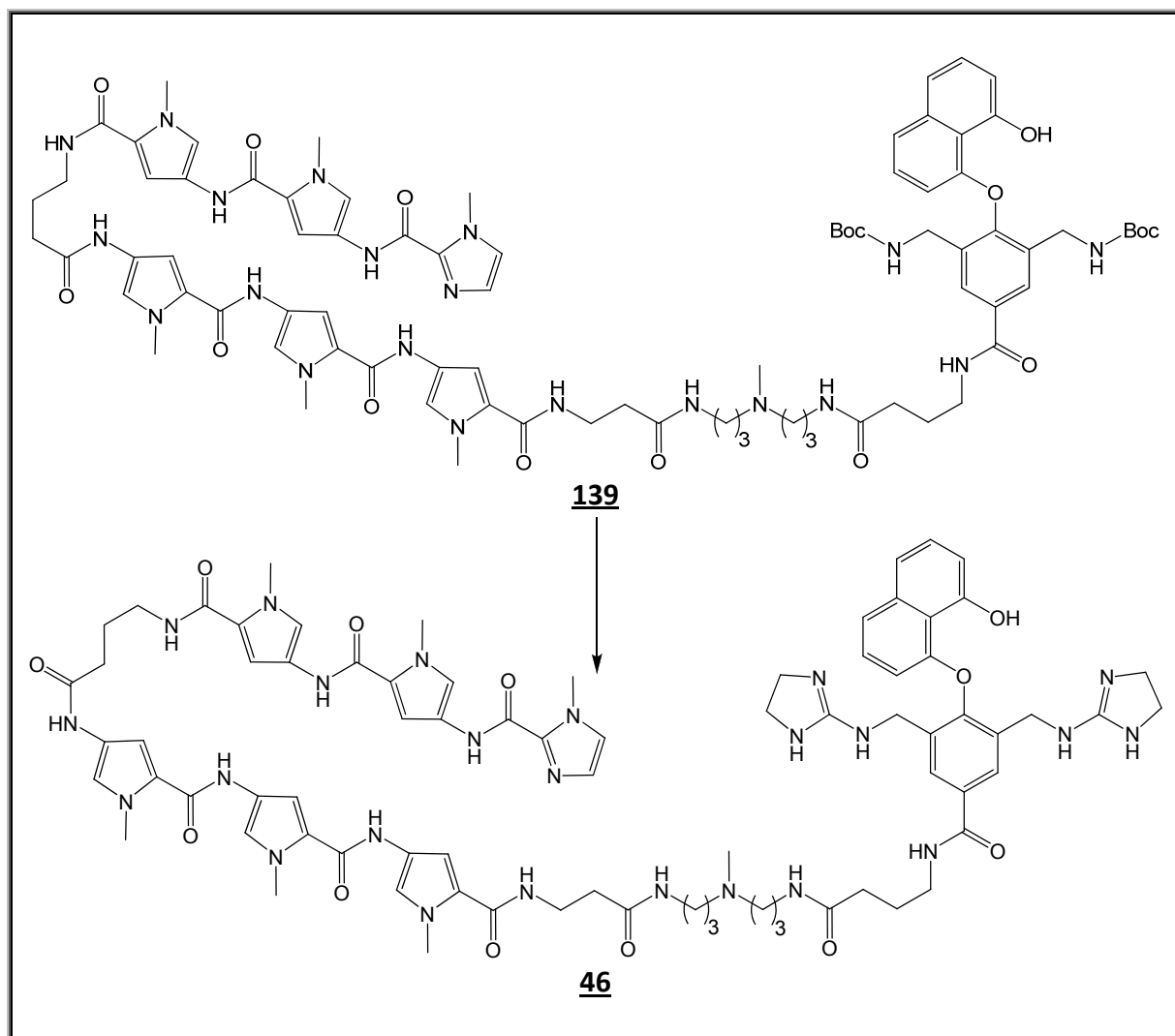
berechnet: 1425.7

gefunden: 1425.2 (M+H<sup>+</sup>)

713.7 (M+2H<sup>+</sup>)



**Abbildung 10-14:** HPLC-Analytik (Gradient) einer semipräparativ getrennten Probe von **140**. Gezeigt ist die ELSD-Spur. Neben geringsten Verunreinigungen bei 1.99 und 19.32 min ist nur eine Hauptkomponente bei 18.64 min zu sehen, die der gesuchten Verbindung entspricht.

10.5.35 Im-Py-Py-γ-Py-Py-Py-β-C<sub>3</sub>-N(Me)-C<sub>3</sub>-γ-45 (**46**)

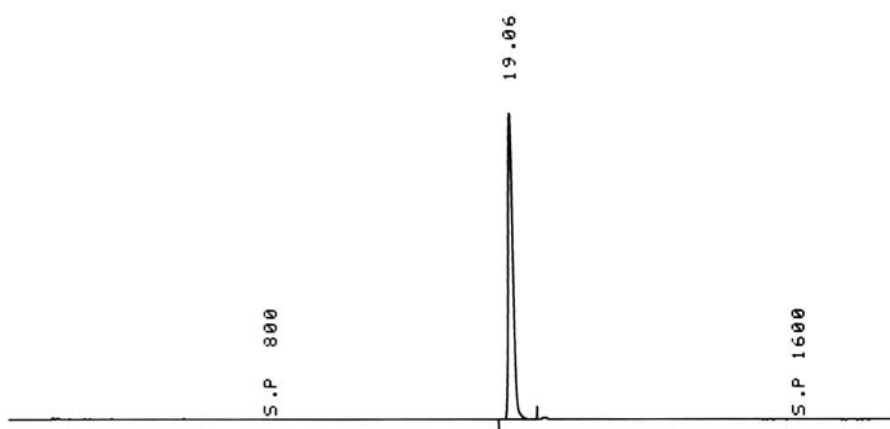
2 ml abs. MeOH werden auf 0 °C gekühlt und langsam 1 ml Acetylchlorid zugetropft. Die entstehende Lösung wird noch weitere 30 min bei 0 °C gerührt, und dann eine Lösung von 0.02 g (0.012 mmol) **139** in 1 ml abs. MeOH zugegeben. Die Lösung wird 30 min bei 0 °C und weitere 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird evaporiert und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wird mit 2 ml einer 2:1-Mischung von abs. MeOH und Net3 aufgenommen, 7.4 mg (0.049 mmol, 4 eq.) **93** zugegeben, und die Reaktionslösung für 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird evaporiert und das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Trocknen im Vakuum wird der Rückstand mit MeOH aufgenommen, durch eine Ionen-Austauschersäule (Dowex 1x8, Chlorid-Form) laufen gelassen, das Lösungsmittel wieder evaporiert und der Rückstand getrocknet. Man erhält **46** als beige-braunen Feststoff als Trihydrochlorid.

**ANALYTISCHE DATEN UND AUSBEUTE:****Ausbeute:** 0.004 g (20 %)

Theorie: 0.02 g

**Masse:** ESI+ (berechnet für  $C_{78}H_{96}N_{24}O_{12}+H^+$ ):

berechnet: 1561.75

gefunden: 1561.2 ( $M+H^+$ )781.7 ( $M+2H^+$ )521.5 ( $M+3H^+$ )

**Abbildung 10-15:** HPLC-Analytik (Gradient) einer semipräparativ (0.1% TFA in  $H_2O$  /  $CH_3CN$  = 74:26) getrennten Probe von **46**. Gezeigt ist die ELSD-Spur, die nur einen einzelnen Peak bei 19.06 min zeigt.

## 10.6 Kinetik-Messung: Umsetzung von 45 mit 35

### 10.6.1 Allgemeines

Alle Reaktanden und Substanzen wurden auf einer Feinwaage genauest möglich in Safe-Lock-Eppendorf-Gefäße eingewogen, mit der erforderlichen Menge Lösungsmittel aufgelöst (wenn notwendig noch mit Ultraschall behandelt), dann in ca. 6 cm lange NMR-Röhrchen überführt und mit den passenden Plastikstopfen verschlossen.

Für die Kinetik gilt eine Reaktionstemperatur von 30 °C, die mit einem Thermostaten eingestellt und über den erforderlichen Zeitraum konstant gehalten wurde. Zu festgelegten Zeitpunkten wurden jeweils 3 µl der Reaktionslösung entnommen, mit 57 µl einer 1:1-Mischung von Wasser und MeOH (enthält 3 % TFA) verdünnt und anschließend mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren, um die Reaktion weitestgehend zu stoppen<sup>[XXII]</sup>. Dann wurden Aliquote von 20 µl der einzelnen Proben via HPLC analysiert. Hierbei wurde die AUC für jede einzelne Probe und für alle relevanten Peaks mit der valley-to-valley-Integrationsmethode bestimmt.

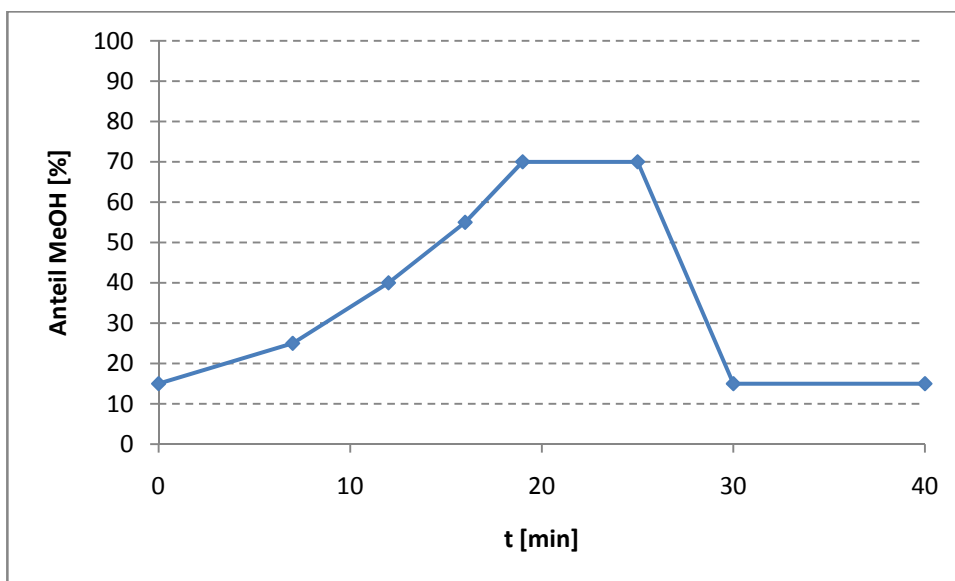
Die Messungen wurden jeweils zweimal und mit dem gleichen Gradienten durchgeführt, der auch schon in Vorgänger-Arbeiten zum Einsatz kam. Die Zusammensetzung (0.1 % TFA in Millipore-Wasser und MeOH) ist in *Tabelle 10-4* aufgelistet und in *Abbildung 10-16* grafisch dargestellt. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0.8 ml/min und die Detektionswellenlänge 275 nm. Für genaue apparative Bedingungen siehe *Kapitel 10.1*.

**Tabelle 10-4:** Zeitlicher Verlauf bzw. Zusammensetzung des verwendeten Gradienten zur Analyse der Reaktions-Komponenten.

<i>Zeit [min]</i>	<i>0.1% TFA [%]</i>	<i>MeOH [%]</i>
Initial	85	15
7	75	25
12	60	40
16	45	55
19	30	70
25	30	70
30	85	15
40	85	15

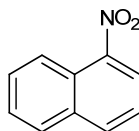
<sup>XXII</sup> Diese Methode eignet sich insbesondere für schnelle Kinetiken wie z.B. die Reaktion mit 30, da in diesem Falle die Proben in kurzen Zeitabständen (5 min) entnommen werden müssen, und eine analytische HPLC-Messung mit dem verwendeten Gradienten 40 min dauert.





**Abbildung 10-16:** Grafische Darstellung des zeitlichen Gradientenverlaufs. Gezeigt ist die Variation des MeOH-Anteils in Abhängigkeit der Zeit.

Als interner Standard wurde (aus Hexan umkristallisiertes) 1-Nitronaphthalin **144** verwendet, welches eine ganze Reihe von Kriterien erfüllt, die für diesen Einsatz notwendig sind: es ist ein kristalliner und gut einwägbarer Feststoff, der unter den Reaktionsbedingungen inert ist, und durch seine Unpolarität so spät im Chromatogramm auftaucht, dass es keinen anderen Peak überlagert.



**144**

**Abbildung 10-17:** Der verwendete interne Standard 1-Nitronaphthalin für die HPLC. Die Substanz wird vor dem Einsatz aus Hexan umkristallisiert und erscheint im Chromatogramm als letzte Verbindung.

Ein interner Standard wird benötigt, um eine zuverlässige Aussage über Quantitätsverhältnisse machen zu können, ohne dabei von Faktoren wie dem injizierten Volumen abhängig zu sein.

Um die Mengenverhältnisse im UV-Detektor vergleichen und eine quantitative Aussage über Zu- bzw. Abnahme machen zu können, müssen die beobachteten Substanzen (hier 4-Nitrophenol und der Bisguanidiniumalkohol **45**) zunächst auf den internen Standard **144** kalibriert werden. Hierzu berechnet man mit *Formel 10-1* den jeweiligen Eichfaktor:

$$\text{Eichfaktor}_{[i]} = \frac{\text{Peakfläche}_{[\text{Standard}]}}{\text{Peakfläche}_{[i]}} * \frac{c_{[i]}}{c_{[\text{Standard}]}}$$

**Formel 10-1:** Mathematische Gleichung zur Bestimmung des Eichfaktors. Der Eichfaktor für die Substanz i ist dimensionslos, die Peakflächen werden ebenso als dimensionslose Werte eingetragen und c steht für die (molare) Konzentration.

Sobald der Eichfaktor bekannt ist, kann man in der laufenden Kinetik zu jedem Zeitpunkt, zu dem eine Probe entnommen und analysiert wird, die Konzentration der beobachteten Verbindung berechnen. Hierzu wird *Formel 10-1* nach  $c_{[i]}$  aufgelöst:

$$c_{[i]} = \frac{Peakfläche_{[i]}}{Peakfläche_{[Standard]}} * c_{[Standard]} * Eichfaktor_{[i]}$$

**Formel 10-2:** Mathematische Formel zur Berechnung der Konzentration von Substanz i zum Zeitpunkt t.

## 10.6.2 Kalibrierung und Bestimmung der Eichfaktoren

Wie bereits beschrieben, ist die Kalibrierung der beobachteten Substanzen 45 und 4-Nitrophenol notwendig, um deren umgesetzte Mengen im Laufe der Reaktion quantifizieren zu können.

### 10.6.2.1 Herstellung der Maßlösung des internen Standards 144

Man benötigt zunächst eine Maßlösung des internen Standards 144, deren Konzentration genau bekannt sein muss. Hierzu wurden 4.99 mg 144 in einem 5 ml Maßkolben eingewogen, mit 2 ml HPLC-MeOH in Lösung gebracht und anschließend bis zur 5 ml Eichmarkierung mit HPLC-MeOH aufgefüllt.

Diese Lösung wird dann verwendet, um die zu kalibrierenden Substanzen aufzulösen.

### 10.6.2.2 Eichung von 4-Nitrophenol

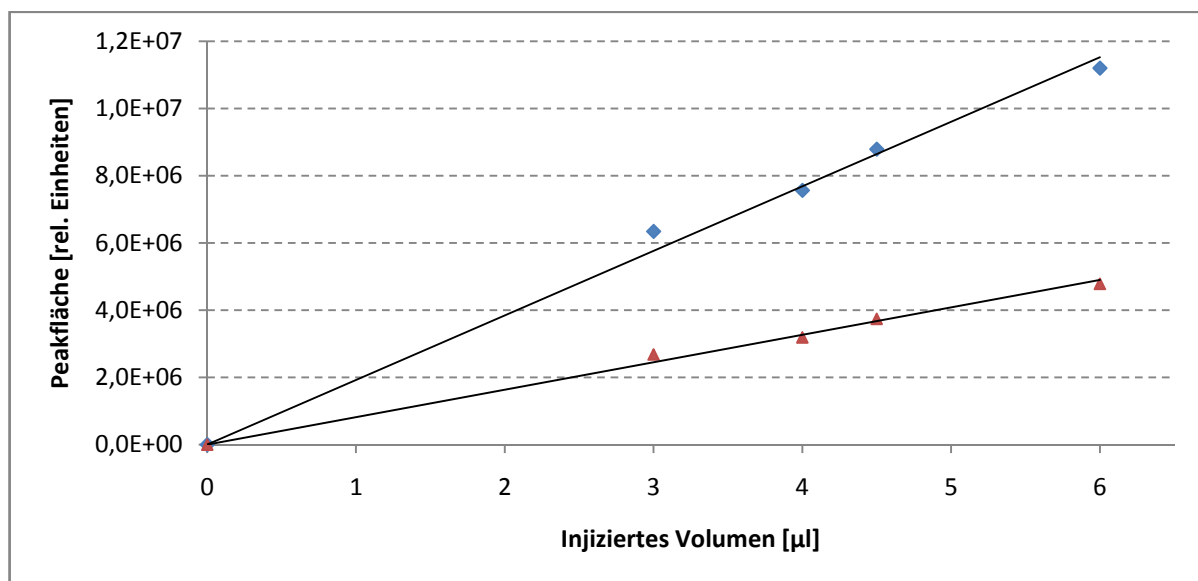
4-Nitrophenol ist die Abgangsgruppe der beobachteten Substitutionsreaktion, und dessen Zunahme soll im zeitlichen Verlauf beobachtet und quantifiziert werden.

In ein Eppendorf-Gefäß wurde 0.99 mg 4-Nitrophenol eingewogen und mit genau 1 ml der genannten Maßlösung von 144 in Lösung gebracht. Hierdurch erhält man ein Substanzgemisch, das 0.99 mg 4-Nitrophenol und 0.998 mg 144 pro ml enthält. Von dieser Mischung wurden dann verschiedene Mengen per HPLC analysiert und die Peakflächen verglichen:

**Tabelle 10-5:** Übersicht über die injizierten Substanzmengen und deren zugehörigen Peakflächen

Injiziert [ $\mu\text{l}$ ]	4-Nitrophenol		<u>144</u>	
	Injiziert [ $\mu\text{g}$ ]	Fläche [rel.]	Injiziert [ $\mu\text{g}$ ]	Fläche [rel.]
3	2.97	6343960	2.99	2683201
4	3.96	7565351	3.99	3189658
4.5	4.46	8789488	4.49	3740519
6	5.94	11202090	5.99	4784932

Die erhaltenen Werte wurden dann grafisch aufgetragen, um eine lineare Zunahme darzustellen bzw. zu überprüfen:



**Abbildung 10-18:** Darstellung der Proportionalität der injizierten Probenmenge. Man sieht eine lineare Zunahme der Peakflächen sowohl für 144 (rotes Dreieck) als auch für 4-Nitrophenol (blaue Raute).

### 10.6.2.3 Eichung vom Bisguanidiniumalkohol 45

Der Bisguanidiniumalkohol 45 ist das Phosphodiester-spaltende Molekül, und wird daher im Verlauf der Reaktion mit 35 in der Konzentration abnehmen. Zur Kalibrierung wurde 1.00 mg in ein Safelock-Eppendorf-Gefäß eingewogen und mit genau 1 ml HPLC-MeOH in Lösung gebracht. Von dieser Lösung wurden dann auch wieder verschiedene Mengen per HPLC analysiert.

**Tabelle 10-6:** Übersicht über die injizierte Substanzmenge und der zugehörigen Peakfläche von **45**.

<b>45</b> <i>Injiziert [<math>\mu</math>l]</i>	<b>45</b> <i>Injiziert [<math>\mu</math>g]</i>	<b>45</b> <i>Fläche [rel.]</i>
5	5.00	2837948
7.5	7.50	3956646
10	10.00	5228081

#### 10.6.2.4 Bestimmung der Eichfaktoren

Durch lineare Regression der gemessenen Werte erhält man dann drei Funktionen, anhand derer einfach die während der Kinetik erhaltenen Flächen in Mengen und dann in Konzentrationen umgerechnet werden können:

**Tabelle 10-7:** Auflistung der errechneten mathematischen Funktionen, die die lineare Zunahme der Peakflächen in Abhängigkeit der injizierten Menge darstellen.

<i>Substanz</i>	<i>Funktion</i>
<b>45</b>	$y = 53045x$
4-Nitrophenol	$y = 192072x$
<b>144</b>	$y = 81829x$

Über die gemessenen Peakflächen und die bekannte Konzentration wurden mit *Formel 10-1* die Eichfaktoren bestimmt:

$$Eichfaktor_{[45]} = \frac{81829}{53045} * \frac{\frac{1.00 \text{ g/l}}{560.17 \text{ g/mol}}}{\frac{0.998 \text{ g/l}}{173.17 \text{ g/mol}}} \approx 1.54 * \frac{1.00 \text{ g/l}}{560.17 \text{ g/mol}} * \frac{173.17 \text{ g/mol}}{0.998 \text{ g/l}} \approx 0.48$$

$$Eichfaktor_{[Nitrophenol]} = \frac{81829}{192072} * \frac{\frac{0.99 \text{ g/l}}{139.11 \text{ g/mol}}}{\frac{0.998 \text{ g/l}}{173.17 \text{ g/mol}}} \approx 0.43 * \frac{0.99 \text{ g/l}}{139.11 \text{ g/mol}} * \frac{173.17 \text{ g/mol}}{0.998 \text{ g/l}} \approx 0.53$$

**Tabelle 10-8:** Übersicht über die berechneten Eichfaktoren für die spätere Kinetik-Messung

<i>Substanz</i>	<i>Eichfaktor</i>
<b>45</b>	0.48
4-Nitrophenol	0.53

Die Werte aus *Tabelle 10-8* sind notwendige Voraussetzungen, um die Kinetik auswerten zu können.

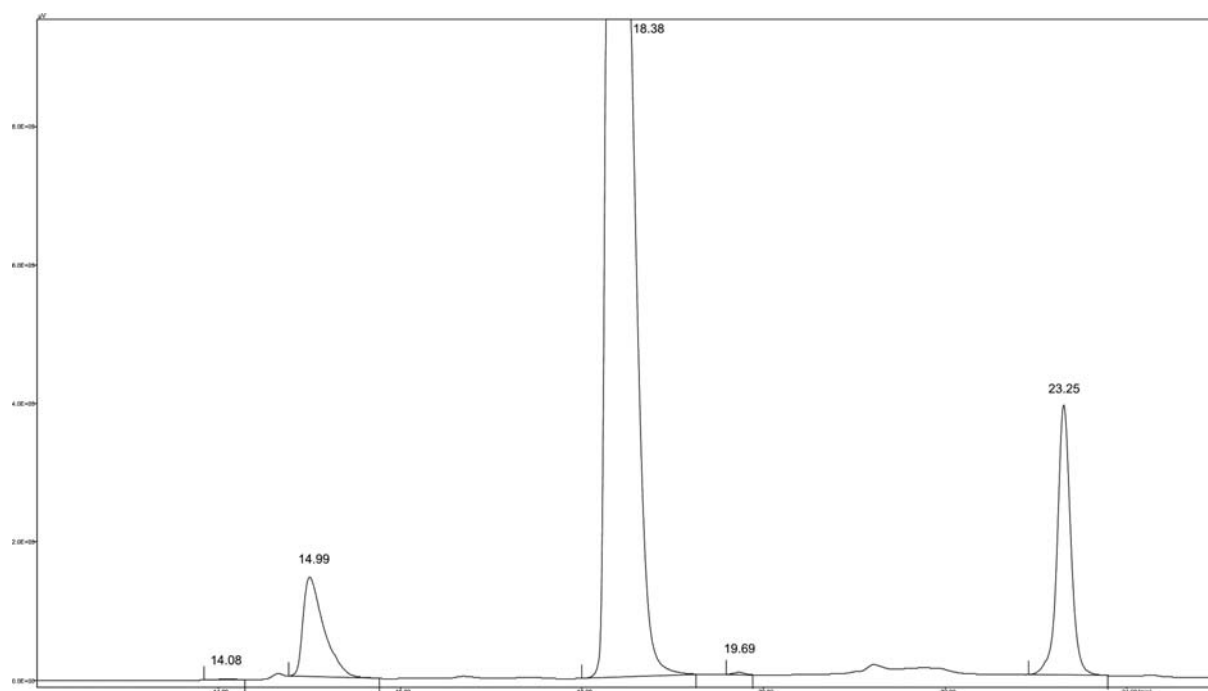
### 10.6.3 Reaktion von 45 mit BNPP 35 unter wasserfreien Bedingungen

Für die Kinetik-Messung wurde ein Maßstab von 0.01 M für 45 gewählt. Damit das Substrat 35 als quasi konstant angenommen werden kann, wird es im dreifachen Überschuss eingesetzt. Die verwendeten Substanzen sind mit Mengenangabe in *Tabelle 10-9* dargestellt:

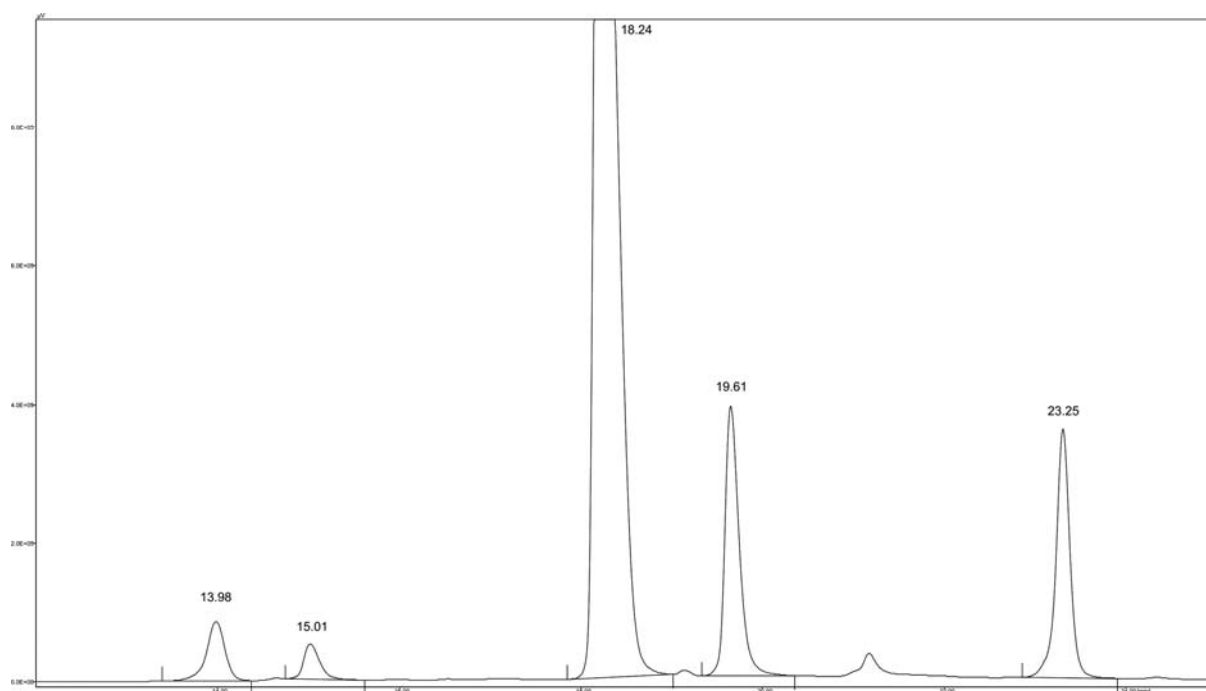
**Tabelle 10-9:** Übersicht über Mengen und Verhältnisse der verwendeten Substanzen für die Umsetzung von 45 mit BNPP 35.

Substanz	MW	c [M]	Menge [mmol]	Menge [mg]
<u>144</u>	173.17	0.03	0.012	2.08
<u>45</u>	560.17	0.01	0.004	2.24
<u>35</u>	455.36	0.03	0.012	5.46

Diese 3 Substanzen werden in 400 µl einer 250 mM DIEA-Lösung in abs. DMF gelöst, in ein verkürztes NMR-Rohr überführt und verschlossen bei 30 °C thermostatisiert. Über einen Zeitraum von etwa 30000 min werden Proben in abnehmender Frequenz entnommen, wobei ein typisches Chromatogramm etwa so aussieht:



**Abbildung 10-19:** Ausschnitt der Minuten 13 bis 25 aus dem Chromatogramm von Sample 1 (48 min nach Start der Kinetik). Man erkennt deutlich 3 große Peaks, die für 45, 35 und 144 stehen.



**Abbildung 10-20:** Ausschnitt der Minuten 13 bis 25 aus dem Chromatogramm von Sample 23 (21540 min nach Start der Kinetik). Der Peak für **45** ist deutlich kleiner geworden, und 2 neue Peaks sind entstanden, die für 4-Nitrophenol und das O-Phosphat von **45** stehen.

Die Retentionszeiten der einzelnen Peaks sind in *Tabelle 10-10* näher erläutert:

**Tabelle 10-10:** Übersicht über die ermittelten Retentionszeiten der auftretenden Substanzen. Die Angaben sind gemittelt und gelten für die verwendete Säule (siehe *Kapitel 10.1*) und den Gradienten aus *Tabelle 10-4*.

Substanz	Retentionszeit
4-Nitrophenol	~ 14.0 min
<b>45</b>	~ 15.0 min
<b>35</b>	~ 18.3 min
O-Phosphat	~ 19.6 min
<b>144</b>	~ 23.3 min

Der Peak bei etwa 19.6 min ist per HPLC abgetrennt und über MALDI (+) identifiziert worden:

gesuchte Masse: 690.2 ( $M+H^+$ )

gefundene Masse: 689.7 ( $M+H^+$ )

Nach Integration ergeben sich folgende Werte für die relevanten Peaks:

**Tabelle 10-11:** Übersicht über die ermittelten Peakflächen (valley-to-valley-Integration) von 4-Nitrophenol, **45** und **144**. Die Werte sind in relativen Einheiten angegeben.

Sample	Zeit [min]	AUC Nitrophenol	AUC <b>45</b>	AUC <b>144</b>
1	48	18186	2242007	4034941
2	104	30702	2231003	4042855
3	153	38952	2161703	3881871
4	200	51944	2123494	3915791
5	254	64014	2284037	4309768
6	305	78795	2444973	4610041
7	355	79554	2107116	3978162
8	405	91202	2071623	4042155
9	457	93220	1923182	3759015
10	506	109050	1997209	3809682
11	551	117437	2089419	3579482
12	1411	247836	1668579	3532155
13	1941	344435	1530837	3733327
14	2869	473067	1396602	3645557
15	3355	538536	1259716	3728243
16	4233	662839	1188249	3803898
17	4808	694246	1035580	3609269
18	5750	762966	983013	3519513
19	6236	838956	844616	3609705
20	7678	910937	693296	3437558
21	9125	1031924	789718	3816282
22	12024	1311611	953505	4608314
23	14333	1169144	627061	3880377
24 <sup>[XXIII]</sup>	21540	23.7	7.9	69.5
25 <sup>[XXIII]</sup>	31637	27.3	5.4	69.6

Setzt man dann die gemessenen Werte und die gegebenen Konzentrationen aus *Tabelle 10-9* in *Formel 10-2* ein, erhält man die Konzentrationen für die Substanz i zur Zeit t. Hier exemplarisch für t = 200 min und für Molekül **45** gezeigt (entsprechende Werte aus *Tabelle 10-11* eingesetzt):

$$c_{[45]} = \frac{\text{Peakfläche}_{[45]}}{\text{Peakfläche}_{[Standard]}} * c_{[Standard]} * \text{Eichfaktor}_{[45]} = \frac{2123494}{3915791} * 0.03 \frac{\text{mol}}{\text{l}} * 0.48 = 0.0078 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

Die Konzentration von **45** beträgt nach 200 min noch 0.0078 mol/l. Die berechneten Werte für jede einzelne Probe sind in *Tabelle 10-12* aufgelistet:

<sup>XXIII</sup> Die abweichenden Werte für die AUC für die Samples 24 und 25 ergeben sich durch den Einsatz der Chrompass-Software, welche nach dem Umbau der HPLC eingesetzt wurde.

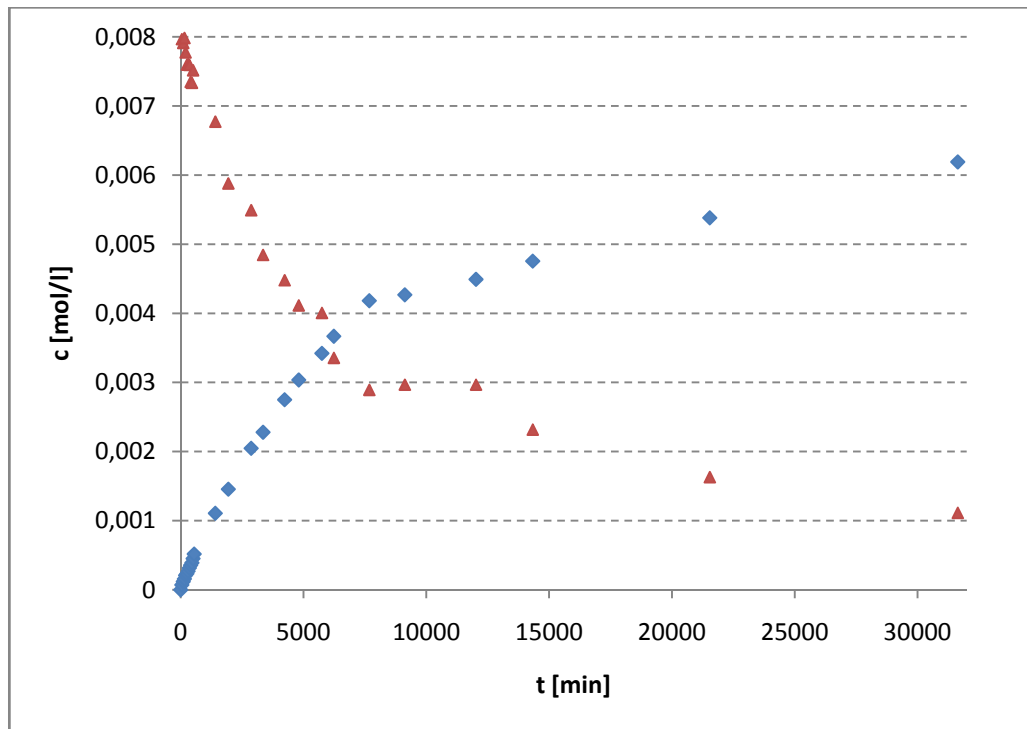
**Tabelle 10-12:** Übersicht über die berechneten Konzentrationen von 4-Nitrophenol und **45**.

<b>Sample #</b>	<b>Zeit [min]</b>	<b>Nitrophenol [mol/l]</b>	<b>45 [mol/l]</b>
1	48	$0.71 \cdot 10^{-4}$	$7.97 \cdot 10^{-3}$
2	104	$1.20 \cdot 10^{-4}$	$7.91 \cdot 10^{-3}$
3	153	$1.58 \cdot 10^{-4}$	$7.98 \cdot 10^{-3}$
4	200	$2.09 \cdot 10^{-4}$	$7.77 \cdot 10^{-3}$
5	254	$2.34 \cdot 10^{-4}$	$7.59 \cdot 10^{-3}$
6	305	$2.70 \cdot 10^{-4}$	$7.60 \cdot 10^{-3}$
7	355	$3.16 \cdot 10^{-4}$	$7.59 \cdot 10^{-3}$
8	405	$3.56 \cdot 10^{-4}$	$7.35 \cdot 10^{-3}$
9	457	$3.91 \cdot 10^{-4}$	$7.33 \cdot 10^{-3}$
10	506	$4.51 \cdot 10^{-4}$	$7.52 \cdot 10^{-3}$
11 <sup>[XXIV]</sup>	551	$5.18 \cdot 10^{-4}$	$8.37 \cdot 10^{-3}$
12	1411	$1.11 \cdot 10^{-3}$	$6.77 \cdot 10^{-3}$
13	1941	$1.46 \cdot 10^{-3}$	$5.88 \cdot 10^{-3}$
14	2869	$2.05 \cdot 10^{-3}$	$5.49 \cdot 10^{-3}$
15	3355	$2.28 \cdot 10^{-3}$	$4.84 \cdot 10^{-3}$
16	4233	$2.75 \cdot 10^{-3}$	$4.47 \cdot 10^{-3}$
17	4808	$3.04 \cdot 10^{-3}$	$4.11 \cdot 10^{-3}$
18	5750	$3.42 \cdot 10^{-3}$	$4.00 \cdot 10^{-3}$
19	6236	$3.67 \cdot 10^{-3}$	$3.35 \cdot 10^{-3}$
20	7678	$4.18 \cdot 10^{-3}$	$2.89 \cdot 10^{-3}$
21	9125	$4.27 \cdot 10^{-3}$	$2.97 \cdot 10^{-3}$
22	12024	$4.49 \cdot 10^{-3}$	$2.97 \cdot 10^{-3}$
23	14333	$4.75 \cdot 10^{-3}$	$2.31 \cdot 10^{-3}$
24	21540	$5.38 \cdot 10^{-3}$	$1.63 \cdot 10^{-3}$
25	31637	$6.19 \cdot 10^{-3}$	$1.11 \cdot 10^{-3}$

Daraus ergibt sich folgender Zusammenhang, der sich in einem c-t-Diagramm darstellen lässt:

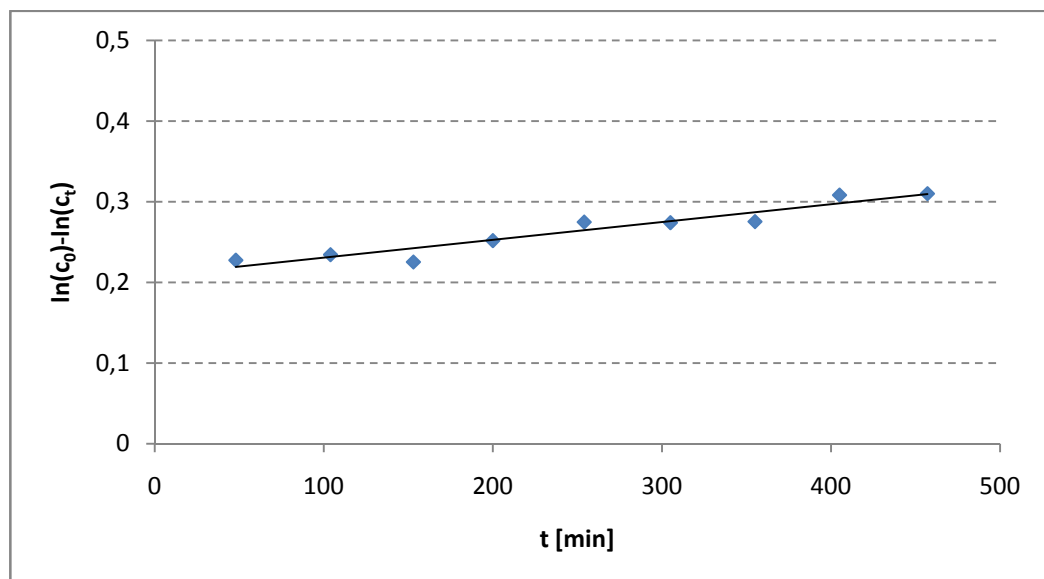
<sup>XXIV</sup> wird als Ausreisser bewertet und nicht berücksichtigt.





**Abbildung 10-21:** Darstellung des zeitlichen Verlaufs der beobachteten Reaktion: Man sieht eine Zunahme der Konzentration für 4-Nitrophenol (blaue Rauten) und eine Abnahme der Konzentration für das Bisguanidin 45 (rote Dreiecke).

Trägt man dann die Differenz der Logarithmen (zur Basis e) der Anfangskonzentration und der Konzentration zum Zeitpunkt t gegen die Zeit auf, kann man für die ersten 500 min einen linearen Zusammenhang erkennen:



**Abbildung 10-22:** Darstellung der Differenz der Logarithmen von  $c_0$  und  $c_t$  der Substanz 45. Aus der Steigung der Geraden kann man  $k_{\text{obs}}$  ablesen.

Über die Steigung erhält man dann für die Abnahme der Konzentration von **45** die scheinbare Geschwindigkeitskonstante  $k_{obs}$ :

$$k_{obs} = 2.21 * 10^{-4} \text{ min}^{-1}$$

## 11. ANHANG

### 11.1 Abkürzungen

$\beta$ -Ala (oder nur $\beta$ )	$\beta$ -Alanin
AP	Apurin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AUC	area under the curve = Peakfläche
2,4-BDNPP	Phosphorsäure-bis(2,4-dinitrophenyl)-ester
4-BNPP	Phosphorsäure-bis(4-nitrophenyl)-ester
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc-ON	2-( <i>tert</i> -Butoxycarbonyloxyimino)-2-phenylacetonitril
BPI	Basispeak-Intensität
br	breit (NMR)
BuLi	Butyllithium
bZIP	basische Leucin-Zipper
d	Dublett (NMR)
c	Konzentration (mol/l)
$c_0$	Initial-Konzentration = Konzentration zum Zeitpunkt $t = 0$
Cbz	Benzyloxycarbonyl
$c_t$	Konzentration zum Zeitpunkt $t$
DC	Dünnschichtchromatogramm
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCU	N,N'-Dicyclohexylharnstoff
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dubletts (NMR)
DD	1,10-Diaminodecan
DDO	1,12-Diaminododecan
DH	1,6-Diaminohexan
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin (Hünig-Base)
DIU	N,N'-Diisopropylharnstoff
DMAP	N,N-Dimethylaminopyridin (Steglich-Katalysator)
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DO	1,8-Diaminooctan
Dp	3-Dimethylamino-1-propylamin

DTPB	1,1,4,7,7-penta-(2'-benzimidazol-2-ylmethyl)-triazasheptane
EA	Elementaranalyse
ECF	Ethylchloroformiat
EDG	Electron-donating group = Elektronenschiebende Gruppe
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
eq.	Äquivalente
ESI	Elektronensprayionisation (MS)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOAc	Ethylacetat, Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
EWG	Electron-withdrawing group = Elektronenziehende Gruppe
Exd	Extradenticle
Fcn	Fluorescein
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FokI	Flavobacterium okeanoikoites I
FPPS	Festphasenpeptidsynthese
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
GABA (oder nur $\gamma$ )	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GCN	General control nonderepressible
HBTU	2-(1-H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HeLa	Henriette Lacks, anonymisiert zu Helene Lane
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hex	Hexan
HIF	Hypoxia inducible factor
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Hox	Homeobox
Hp	Hydroxymethylpyrrol
HR / HighRes	High-resolution (Massenspektrometrie)
HRE	Hypoxia response element
Im	N-Methylimidazol
IR	Infrarot
LDA	Lithiumdiisopropylamid
LILBID	Laser-induced liquid bead ion desorption (MS)
Lit	Literatur
m	Multipllett (NMR); medium (IR); milli
M	molare Konzentration = mol/l
MALDI	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization (MS)

MIEP	Major immediate early promotor
4-MNPP	Phosphorsäure-methyl-4-nitrophenylester
MS	Massenspektrometrie
n	nano
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
oc	open-circle
PDC	Pyridiniumdichromat
Pur	Purin
Py	N-Methylpyrrol
Pyr	Pyrimidin
q	Quartett (NMR)
qn	Quintett (NMR)
RP	reversed phase
RT	Raumtemperatur (20 bis 25 °C)
s	Singulett (NMR), strong (IR)
Sdp	Siedepunkt
Smp	Schmelzpunkt
spg	silyl protecting group
sx	Sextett (NMR)
t	Triplett (NMR)
T	Temperatur
T3P	2,4,6-Tripropyl-1,3,5,2,4,6-trioxatriphosphorinane-2,4,6-trioxid
TALE	Three amino acid loop extension
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TCEC	Trichloressigsäurechlorid
TEA	Triethylamin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamine
TF	Transkriptionsfaktor
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMG / TMG <sup>+</sup>	Tetramethylguanidin / Tetramethylguanidinium
TMS	Trimethylsilyl
Ubx	Ultrabithorax
VEGF	vascular endothelial growth factor
w	weak (IR)

## 11.2 Literaturverzeichnis

- [1] K. C. Nicolaou, S. A. Snyder, *Angew. Chem.*, **2005**, 117, 1036-1069
- [2] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature*, **1953**, 171, 737-738
- [3] R. E. Dickerson, H. R. Drew, B. N. Conner, R. M. Wing, A. V. Fratini, M. L. Kopka, *Science*, **1982**, 216, 475-485
- [4] F. H. Westheimer, *Science*, **1987**, 235(4793), 1173-1178
- [5] R. Ott, R. Krämer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1999**, 52, 761-767
- [6] D. M. Perreault, E. V. Anslyn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1997**, 36(5), 432-450
- [7] A. J. Kirby, M. Younas, *J. Chem. Soc. (B)*, **1970**, 510-513
- [8] A. J. Kirby, M. Younas, *J. Chem. Soc. (B)*, **1970**, 1165-1172
- [9] C. A. Bunton, S. J. Faber, *J. Org. Chem.* **1968**, 34(4), 767-772
- [10] A. Williams, *Adv. Phys. Org. Chem.* **1992**, 27, 1
- [11] M. Komiyama, N. Takeda, H. Shigekawa, *Chem. Commun.*, **1999**, 16, 1443-1451
- [12] B. Krebs, T. Klabunde, W. Lipscomb, N. Sträter, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2158-2191
- [13] J. Stubbe, J. W. Kozarich, *Chem. Rev.*, **1987**, 87(5), 1107-1136
- [14] E. H. Serpersu, D. Shortle, A. S. Mildvan, *Biochemistry*, **1987**, 26, 1289-1300
- [15] J. K. Judice, T. R. Gamble, E. C. Murphy, A. M. de Vos, P. G. Schultz, *Science*, **1993**, 261, 1578-1581
- [16] M. R. Redinbo, J. J. Champoux, W. G. J. Hol, *Biochemistry*, **2000**, 39, 6832-6840
- [17] L. Stewart, M. R. Redinbo, X. Qiu, W. G. J. Hol, J. J. Champoux, *Science*, **1998**, 279, 1534-1541
- [18] F. Mancin, P. Scrimin, P. Tecilla, U. Tonellato, *Chem. Commun.*, **2005**, 2540-2548
- [19] T. A. Shell, D. L. Mohler, *Curr. Org. Chem.*, **2007**, 11(17), 1525-1542
- [20] F. Mancin, P. Tecilla, *New J. Chem.*, **2007**, 31, 800-817
- [21] W. K. Pogozelski, T. D. Tullius, *Chem. Rev.*, **1998**, 98(3), 1089-1107
- [22] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.*, **1998**, 98(3), 1109-1151
- [23] C. Liu, M. Wang, T. Zhang, H. Sun, *Coord. Chem. Rev.*, **2004**, 248, 147-168
- [24] M. Komiyama, J. Sumaoka, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1998**, 2(6), 751-757
- [25] J. Weston, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 2151-2174

- [26] C. Liu, S. Yu, D. Li, Z. Liao, X. Sun, H. Xu, *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 913-922
- [27] T. Hirohama, H. Arii, M. Chikira, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, 98(11), 1778-1786
- [28] C. Sissi, F. Mancin, M. Gatos, M. Palumbo, P. Tecilla, U. Tonellato, *Inorg. Chem.*, **2005**, 44(7), 2310-2317
- [29] X. Sheng, X.-M. Lu, G.-Y. Lu, Y. Shao, F. Liu, Q. Xu, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19(2), 490-498
- [30] A. Nomura, Y. Sugiura, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126(47), 15374-15375
- [31] A. Nomura, Y. Sugiura, *Inorg. Chem.*, **2004**, 43(5), 1708-1713
- [32] Y. Hori, K. Suzuki, Y. Okuno, M. Nagaoka, S. Futaki, Y. Sugiura, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122(32), 7648-7653
- [33] M. Yokono, N. Saegusa, K. Matsushita, S. Futaki, Y. Sugiura, *Biochemistry*, **1998**, 37(19), 6824-6832
- [34] V. Zeevi, A. Tovkach, T. Tzfira, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105(35), 12785-12790
- [35] F. H. Zelder, A. A. Mokhir, R. Krämer, *Inorg. Chem.*, **2003**, 42, 8618-8620
- [36] X. Sheng, X.-M. Lu, J.-J. Zhang, Y.-T. Chen, G.-Y. Lu, Y. Shao, F. Liu, Q. Xu, *J. Org. Chem.*, **2007**, 72(5), 1799-1802
- [37] Q. Yang, J. Xu, Y. Sun, Z. Li, Y. Li, X. Qian, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 803-806
- [38] L. Fernandes, F. L. Fischer, C. W. Ribeiro, G. P. Silveira, M. M. Sá, F. Nome, H. Terenzi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 4499-4502
- [39] M. W. Göbel, J.W. Bats, G. Dürner, *Angew. Chem.*, **1992**, 104, 217-218
- [40] M. W. Göbel, Habilitationsschrift „Auf dem Weg zu synthetischen Phosphodiesterasen: Supramolekulare Funktionseinheiten mit kationischen Substrat-Bindungsstellen“, Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main, **1993**
- [41] E. T. Kaiser, T. W. S. Lee, F. P. Boer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 2351-2353
- [42] E. T. Kaiser, K. Kudo, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 6725-6728
- [43] R. Gross, G. Dürner, M. W. Göbel, *Liebigs Ann. Chem.*, **1994**, 49-58
- [44] M.-S. Muche, Dissertation, Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main, **1996**
- [45] A. Büsing, Dissertation „Synthese und Eigenschaften biarylischer Bis(guanidinium)-Alkohole“, Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main, **2000**
- [46] Z. Nazir, Diplomarbeit, Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main, **2000**

- [47] Z. Nazir, Dissertation „Synthetische Nucleasen auf der Basis von Bis(guanidinium)-alkoholen“, Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main, **2004**
- [48] P. Simon, F. Cannata, L. Perrouault, L. Halby, J.-P. Concordet, A. Boutorine, V. Ryabinin, A. Sinyakov, C. Giovannangeli, *Nucl. Acids Res.*, **2008**, 36(11), 3531-3538
- [49] K. Schmitz, U. Schepers, *Angew. Chem.*, **2004**, 116, 2526-2529
- [50] D. J. Patel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1982**, 79, 6424-6428
- [51] W. S. Wade, M. Mrksich, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114(23), 8783-8794
- [52] M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.*, **1985**, 183, 553-563
- [53] M. Coll, C. A. Frederick, A. H.-J. Wang, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, 84, 8385-8389
- [54] R. E. Klevit, D. E. Wemmer, B. R. Reid, *Biochemistry*, **1986**, 25, 3296-3303
- [55] J. G. Pelton, D. E. Wemmer, *Biochemistry*, **1988**, 27, 8088-8096
- [56] J. G. Pelton, D. E. Wemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, 86, 5723-5727
- [57] D. E. Wemmer, *Biopolymers*, **1999**, 52(4), 197-211
- [58] J. G. Pelton, D. E. Wemmer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 1393-1399
- [59] M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 1376-1380
- [60] J. W. Lown, K. Krowicki, U. G. Bhat, A. Skorobogaty, B. Ward, J. C. Dabrowiak, *Biochemistry*, **1986**, 25, 7408-7416
- [61] T. J. Dwyer, B. H. Geierstanger, Y. Bathini, J. W. Lown, D. E. Wemmer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 5911-5919
- [62] S. White, J. W. Szewczyk, J. M. Turner, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Nature*, **1998**, 391, 468-471
- [63] P. B. Dervan, B. S. Edelson, *Curr. Op. Struct. Biol.*, **2003**, 13, 284-299
- [64] P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9, 2215-2235
- [65] M. Mrksich, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 3663-3664
- [66] M. Mrksich, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 9892-9899
- [67] M. Mrksich, M. E. Parks, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 7983-7988
- [68] D. M. Herman, E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 1382-1391



- [69] S. White, E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 8756-8765
- [70] J. J. Kelly, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 6981-6985
- [71] J. W. Trauger, E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120(14), 3534-3535
- [72] D. M. Herman, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Chem. Eur. J.*, **1999**, 5(3), 975-983
- [73] I. Kers, P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, 10, 3339-3349
- [74] P. Weyermann, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124(24), 6872-6878
- [75] A. Heckel, P. B. Dervan, *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 3353-3366
- [76] C. F. Hsu, J. W. Phillips, J. W. Trauger, M. E. Farkas, J. M. Belitsky, A. Heckel, B. Z. Olenyuk, J. W. Puckett, C. C. C. Wang, P. B. Dervan, *Tetrahedron*, **2007**, 63, 6146-6151
- [77] P. B. Dervan, R. M. Doss, M. A. Marques, *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents*, **2005**, 5, 373-387
- [78] P. B. Dervan, A. T. Poulin-Kerstien, E. J. Fechter, B. S. Edelson, *Top. Curr. Chem.*, **2005**, 253, 1-31
- [79] L. Neely, J. W. Trauger, E. E. Baird, P. B. Dervan, J. M. Gottesfeld, *J. Mol. Biol.*, **1997**, 274(4), 439-445
- [80] J. M. Gottesfeld, L. Neely, J. W. Trauger, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Nature*, **1997**, 387, 202-205
- [81] J. E. Darnell, *Nature Rev. Cancer*, **2002**, 2, 740-749
- [82] L. A. Dickinson, R. J. Gulizia, J. W. Trauger, E. E. Baird, D. E. Mosier, J. M. Gottesfeld, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 12890-12895
- [83] N. R. Wurtz, J. L. Pomerantz, D. Baltimore, P. B. Dervan, *Biochemistry*, **2002**, 41(24), 7604-7609
- [84] B. Z. Olenyuk, G.-J. Zhang, J. M. Klco, N. G. Nickols, W. G. Kaelin, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, 101(48), 16768-16773
- [85] E. J. Fechter, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125(28), 8476-8485
- [86] J. M. Gottesfeld, J. M. Belitsky, C. Melander, P. B. Dervan, K. Luger, *J. Mol. Biol.*, **2002**, 321(2), 249-263
- [87] R. S. Edayathumangalam, P. Weyermann, J. M. Gottesfeld, P. B. Dervan, K. Luger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, 101(18), 6864-6869
- [88] L. A. Dickinson, J. W. Trauger, E. E. Baird, P. Ghazal, P. B. Dervan, J. M. Gottesfeld, *Biochemistry*, **1999**, 38(33), 10801-10807

- [89] A. K. Mapp, A. Z. Ansari, M. Ptashne, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, 3930-3935
- [90] A. Z. Ansari, A. K. Mapp, D. H. Nguyen, P. B. Dervan, M. Ptashne, *Chem. Biol.*, **2001**, 8, 583-592
- [91] P. S. Arora, A. Z. Ansari, T. P. Best, M. Ptashne, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124(44), 13067-13071
- [92] H.-D. Arndt, K. E. Hauschild, D. P. Sullivan, K. Lake, P. B. Dervan, A. Z. Ansari, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 13322-13323
- [93] C. C. C. Wang, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123(36), 8657-8661
- [94] A. Y. Chang, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122(20), 4856-4864
- [95] N. R. Wurtz, P. B. Dervan, *Chem. Biol.*, **2000**, 7(3), 153-161
- [96] R. Takahashi, T. Bando, H. Sugiyama, *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11(12), 2503-2509
- [97] J. M. Belitsky, S. J. Leslie, P. S. Arora, T. A. Beerman, P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, 10(10), 3313-3318
- [98] T. P. Best, B. S. Edelson, N. G. Nickols, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100(21), 12063-12068
- [99] K. S. Crowley, D. P. Phillion, S. S. Woodard, B. A. Schweitzer, M. Singh, H. Shabany, B. Burnette, P. Hippenmeyer, M. Heitmeier, J. K. Bashkin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13(9), 1565-1570
- [100] S. Ullrich, Diplomarbeit „Synthese von Aminopyrrol- und Aminoimidazol-carbonsäuren als Bausteine DNA-bindender Peptide“, Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt am Main, **2004**
- [101] P. V. Vyas, A. K. Bhatt, G. Ramachandraiah, A. V. Bedekar, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 4085-4088
- [102] N. Detzer, O. Burkhard, H. Schaffrin, W. Liptay, *Z. Naturforsch. B*; **1987**, 42(9), 1129-1141
- [103] D. Clive, L. J. A. Gaetan Angoh, S. M. Bennett, *J. Org. Chem.*, **1987**, 52(7), 1339-1342
- [104] H. T. Clarke, E. R. Taylor, *Org. Syn. Coll. Vol. 2*, 135
- [105] Y. Sasson, G. D. Zappi, R. Neumann, *J. Org. Chem.*, **1986**, 51(15), 2880-2883
- [106] H. E. Zaugg, R. T. Rapala, *Org. Syn. Coll. Vol. 3*, 820
- [107] M. S. Newman, L. L. Wood, *J. Org. Chem.*, **1958**, 23(8), 1236-1237

- [108] O. Kamm, A. O. Matthews, *Org. Syn. Coll. Vol. 1*, 392
- [109] A. G. M. Barrett, F. Blaney, A. D. Campbell, D. Hamprecht, T. Meyer, A. J. P. White, D. Witty, D. J. Williams, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67(9), 2735-2750
- [110] M.-S. Muche, M. W. Göbel, *Angew. Chem.*, **1996**, 108(18), 2263-2265
- [111] J. Xiao, G. Yuan, W. Huang, A. S. C. Chan, K.-L. D. Lee, *J. Org. Chem.*, **2000**, 65(18), 5506-5513
- [112] D. Harris, M. Stewart, A. Sielaff, K. Mulder, T. Brown, H. Mackay, M. Lee, *Heterocyclic Commun.*, **2007**, 13(1), 17-23
- [113] E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118(26), 6141-6146
- [114] N. R. Wurtz, J. M. Turner, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Org. Lett.*, **2001**, 3(8), 1201-1203
- [115] D. Jaramillo, Q. Liu, J. Aldrich-Wright, Y. Tor, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69(23), 8151-8153
- [116] J. W. Lown, K. Krowicki, *J. Org. Chem.*, **1985**, 50(20), 3774-3779
- [117] Z. Dogan, R. Paulini, J. A. R. Stütz, S. Narayanan, C. Richert, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126(15), 4762-4763
- [118] R. Kumar, J. W. Lown, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 2630-2647
- [119] T. Bando, A. Narita, I. Saito, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125(12), 3471-3485
- [120] E. Nishiwaki, H. Lee, T. Matsumoto, K. Toyooka, H. Sakurai, M. Shibuya, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31(9), 1299-1302
- [121] S.-J. Moon, J. W. Jeon, H. Kim, M. P. Suh, J. Suh, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122(32), 7742-7749
- [122] E. J. Corey, I. Szekely, C. S. Shiner, *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 40, 3529-3532
- [123] W. Baker, W. D. Ollis, *J. Chem. Soc.*, **1949**, 345-348
- [124] K. Kondo, T. Nagura, Y. Arai, I. Inoue, *J. Med. Chem.*, **1979**, 22(6), 639-646
- [125] N. N. Sergeeva, A. S. Golubev, K. Burger, *Synthesis*, **2001**, 2, 281-285
- [126] R. Kumar, J. W. Lown, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 2630-2647
- [127] J. S. Taylor, P. G. Schultz, P. B. Dervan, *Tetrahedron*, **1984**, 40(3), 457-465
- [128] A. P. Krapcho, C. S. Kuell, *Synth. Commun.* **1990**, 20(16), 2559-2564
- [129] C. Hunger, Dissertation "Massenspektrometrische Untersuchungen von DNA, RNA und nichtkovalenten Oligonukleotid-Komplexen", Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main, **2005**

- [130] W. Kleinekofort, A. Pfenninger, T. Plomer, C. Griesinger, B. Brutschy, *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Proc.*, **1996**, 156(3), 195-202
- [131] N. Morgner, H.-D. Barth, B. Brutschy, *Aust. J. Chem.*, **2006**, 59, 109-114
- [132] A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, 74(2), 560-564
- [133] K. S. Kumar, K. Suvardhan, D. Rekha, B. Jayaraj, P. Chiranjeevi, *Helv. Chim. Acta*, **2005**, 88(5), 1022-1027
- [134] A. Alvarez-Larena, J. F. Piniella, J. I. Borrell, A. Vidal-Ferran, P. Victory, G. Germain, *Acta Cryst. C*, **1992**, 48, 208-209
- [135] A. P. Lurie, G. H. Brown, J. R. Thirtle, A. Weissberger, *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, 83, 5015-5019
- [136] A. Treibs, F.-H. Kreuzer, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1969**, 721, 105
- [137] E. Nishiwaki, S. Tanaka, H. Lee, M. Shibuya, *Heterocycles*, **1988**, 27(8), 1945-1952
- [138] K. F. Turchin, S. L. Grokhovskii, A. L. Zhuze, B. P. Gottikh, *Sov. J. Bioorg. Chem. (Engl. Transl.)*, **1978**, 4, 780-790
- [139] D. L. Garmaise, R. Schwartz, A. F. McKay, *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80(13), 3332-3334

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten:

Name: Ullrich  
Vorname: Stefan  
Geburtsdatum: 18.09.1976  
Geburtsort: Hanau  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulischer Werdegang:

1983 – 1987	Friedrich-Ebert Grundschule
1987 – 1997	Hohe Landesschule Gymnasium
10/1997	Aufnahme des Studiums der Chemie (Diplom) an der Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main
04/2000	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
12/2003	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
01/2004-08/2004	Diplomarbeit im Arbeitskreis Prof. Dr. M. W. Göbel am Institut für organische Chemie und Chemische Biologie an der Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main: „Synthese von Aminopyrrol- und Aminoimidazol-carbonsäuren als Bausteine DNA-bindender Peptide“
09/2004-09/2008	Promotion im Arbeitskreis Prof. Dr. M. W. Göbel am Institut für organische Chemie und Chemische Biologie an der Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main: „Sequenzselektive, metallfreie DNA-Spalter auf der Basis von Bisguanidiniumalkoholen“

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation zum Thema "Sequenzselektive, metallfreie DNA-Spalter auf der Basis von Bisguanidiniumalkoholen" selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 19.01.2009